



**KIS MOLEKULATÖMEGŰ ANYAGOK
SZERKEZETFELDERÍTÉSE LÁGYIONIZÁCIÓS
TÖMEGSPEKTROMETRIAI MÓDSZEREKKEL**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Nagy Lajos

Témavezető: **Dr. Kéki Sándor**

egyetemi docens

Debreceni Egyetem,
Alkalmazott Kémiai Tanszék
Debrecen, 2009.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Kémiai Doktori Iskola Makromolekuláris és Felületi kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK Doktori (Ph.D.) fokozatának megszerzése céljából.

Debrecen, 2009.

Nagy Lajos

Tanúsítom, hogy Nagy Lajos doktorjelölt 2004-2007 között a fent megnevezett Doktori Iskola Makromolekuláris és Felületi Kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a Jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2009.

Dr. Kéki Sándor
egyetemi docens

POLIMEREK ÉS KIS MOLEKULATÖMEGŰ ANYAGOK SZERKEZET FELDERÍTÉSE LÁGYIONIZÁCIÓS TÖMEGSPEKTROMETRIAI MÓDSZEREKKEL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: Nagy Lajos okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem kémia doktori programja
(Makromolekuláris és Felületi Kémia alprogramja) keretében

Témavezető: Dr. Kéki Sándor egyetemi docens

A Doktori Szigorlati Bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja:

Az értekezés bírálói.

Dr.

Dr.

A Bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja:

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnak Dr. Kéki Sándornak, a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszék vezetőjének, aki mind szakmai, mind emberi szempontból hasznos tanácsaival a segítségemre volt doktori munkám során.

Köszönöm továbbá Dr. Zsuga Miklós egyetemi tanárnak, hogy számos tanácsával segítette munkámat és pályafutásomat.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Török János egyetemi adjunktusnak, akivel bármilyen szakmai problémát meg tudtam beszélni, és aki egész munkám során segítségemre volt.

Köszönöm Dr. Deák György egyetemi docens és Dr. Nagy Miklós egyetemi adjunktusnak, hogy észrevételeivel és technikai tanácsaival segítette munkámat.

Köszönöm továbbá Rózsáné Lukács Julianna és Őzséné Fábíán Anette vegyésztechnikusoknak a munkámhoz, valamint Szalay Tibornénak az adminisztrációban nyújtott segítségét.

Hálával tartozom az Alkalmazott Kémiai Tanszék valamennyi munkatársának is, valamint mindazoknak, akik valamilyen formában hozzájárultak ezen értekezés elkészítéséhez.

Szeretném külön megköszönni feleségemnek, Nagyné Berzovicz Cecíliának és családomnak, hogy biztosították számomra a nyugodt családi légkört, amely nélkül ez a disszertáció nem készült volna el.

Végül megköszönöm a következő pályázatoknak és alapítványoknak a munkám során nyújtott anyagi segítséget: OTKA K-62213, K-72524 és MU-00204/2001, RET-006/2004, illetve GVOP-3.2.1.-2004-04-0152/3.0.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés.....	6
II. Irodalmi háttér.....	8
II.1. A tömegspektrometria kialakulásának rövid története.....	8
II.2. A tömegspektrométerek felépítése és működése.....	9
II.2.1. Mintabevitel.....	9
II.2.2. Ionforrások.....	10
II.2.3. Tömeganalizátorok.....	12
II.2.4. Detektorok, jelfeldolgozás.....	13
II.2.5. Tandem tömegspektrometria (MS/MS).....	14
II.3. A MALDI-TOF tömegspektrometria.....	15
II.3.1. A MALDI-TOF MS elve.....	15
II.3.2. A repülési idő (TOF) analizátor működése.....	17
II.3.3. Delayed extraction és reflektoron.....	20
II.3.4. Mintaelőkészítés.....	21
II.3.5. Különböző anyagok azonosítása MALDI technikával.....	23
II.3.6. Fragmentáció MALDI technika esetén.....	23
II.4. Az ESI-TOF tömegspektrometria.....	24
II.4.1. Az ESI-TOF tömegspektrometria alapjai.....	24
II.4.2. Karakterizálás ESI-TOF technika esetén és összehasonlítása a MALDI-val.....	28
II.4.3. Fragmentáció elektropray technika esetén.....	29
II.5. Az ESI és a MALDI MS egyéb alkalmazásai.....	29
III. Felhasznált anyagok, alkalmazott készülékek és a mintaelőkészítés.....	31
III.1. Felhasznált anyagok.....	31
III.2. Alkalmazott műszeres módszerek és szoftverek.....	32
III.3. Mintaelőkészítés.....	34
IV. Eredmények és értékelésük.....	35
IV.1. Klaszter-molekula kölcsönhatás vizsgálata.....	35
IV.2. Kis molekulatömegű vegyületek fragmentációjának vizsgálata PSD MALDI-TOF MS/MS és ESI-CID körülmények között.....	41
IV.2.1. Benzotiazepin-származékok vizsgálata.....	41

IV.2.2. Benzoxazepin-származékok vizsgálata.....	49
IV.2.3. 1,3,5-triszubsztituált-2-pirazolin származékok vizsgálata.....	56
IV.2.4. Fe(II)-fenantrolin komplexek relatív stabilitásának meghatározása ESI-CID körülmények között.....	67
V. Összefoglalás.....	73
VI. Summary.....	75
VII. Irodalomjegyzék.....	76
VIII. Tudományos közlemények és előadások.....	85

I. Bevezetés

A tömegspektrometria ma már közel 100 évre tekint vissza. Segítségével olyan jelentős felfedezések történtek, mint például: atomtömegek pontos meghatározása, új izotópok felfedezése, kvantitatív gázanalízis. A fejlődés olyan nagymértékű a tömegspektrometriában, hogy ma már egyike a leghatékonyabb technikáknak. Nagy pontossága, érzékenysége és szelektivitása lehetővé teszi a nyomokban előforduló anyagok, szennyezők kimutatását, amely a mai meglehetősen szigorú környezetvédelmi előírásoknál vagy az élelmiszeriparban elengedhetetlen.

Napjainkban jelentős erőfeszítések folynak minél kisebb, kompaktabb tömegspektrométerek fejlesztésére, valamint a számos ionizációs technika mellett újabb ionizációs módszerek kidolgozása érdekében. A mintegy húsz éve kifejlesztett MALDI (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization) és ESI (**E**lectro**S**pray **I**onization) ionizációs technikák kiváló lehetőséget biztosítanak nem illékony, nagy molekulatömegű biomolekulák, szintetikus és biopolimerek vizsgálatára.

Az elmúlt közel egy évtizedben a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén meglehetősen nagymértékű fejlődés ment végbe, melynek eredményeképpen 2000-ben került a tanszékre a Bruker gyártmányú MALDI-TOF tömegspektrométer, majd 2002-ben a BRUKER ESI-TOF tömegspektrométer, amely pontosabb és érzékenyebb műszer, valamint kisebb molekulák szerkezetének meghatározására jobban alkalmazható. Az utóbbi műszert 2004-ben felváltotta egy újabb BRUKER ESI-TOF tömegspektrométer, amelynél a nagyobb pontosság és érzékenység mellett MS/MS mérésre is van lehetőség. Az utóbbi két évben az ESI ionforrás mellé beszereztünk két újabbat az APCI (atmoszférikus kémiai ionizáció) és az APPI (atmoszférikus fotoionizáció) ionforrásokat, melyekkel apoláros molekulák, polimerek is ionizálhatóak.

Jelen disszertációban a MALDI-TOF MS, PSD MALDI-TOF MS/MS („post-source” decay) és az ESI-TOF MS, MS/MS, *kvázi* MS/MS (CID: ütközés indukált disszociáció) módszerek alkalmazását mutatom be különböző kémiai rendszereken. A nyert információkból a kémiai rendszerek tömegspektrometriás viselkedésére, ionizációjára, fragmentációjának mechanizmusára lehet következtetni.

A disszertáció három fő részre tagolható. Az első rész a MALDI körülmények között kialakuló klaszter-molekula kölcsönhatásokat mutatja be néhány különböző vegyületcsaládba tartozó molekulán keresztül. A klasztereknek a nanotechnikában vagy katalíziseknél jelentős szerepe van, a MALDI technika segítségével nemcsak előállítani, de ezen klaszterek egy

molekulával való kölcsönhatását is vizsgálni lehet. MALDI-ban az ezüst sókat gyakran alkalmazzák apoláris molekulák, polimerek ionizációjára, a klaszterképződés azonban csökkenti az ionizáció mértékét, valamint új klaszter-molekula addukt ionok megjelenését eredményezheti. A második részben kis molekulatömegű vegyületek (benzotiazepin- és benzoxazepin-származékok) fragmentációjával foglalkozom MALDI és ESI körülmények között. Az említett két származék, számos biológiai hatásának köszönhetően, nagy jelentőséggel bír a gyógyszeriparban (görcsoldó, nyugtató hatású készítmények). Lehetőségünk van például a protonnal képzett addukt ionok fragmentációs mechanizmusának meghatározására és összehasonlítására a két technika esetén, amely segítséget nyújthat a szerkezetfelderítésben vagy a vizsgált molekula mellett megjelenő csúcsok azonosításában. A harmadik rész különböző Fe (II)-fenantrolin komplexek relatív stabilitását tárgyalja. Ha megfelelően nagy energiát közlünk egy adott komplex vegyülettel, akkor az gázfázisban fragmentálódik. A bomláshoz szükséges küszöbenergia a komplex stabilitásától függ, így módon lehetőségünk van bizonyos komplexek gázfázisú stabilitásának vizsgálatára is.

II. Irodalmi háttér

II. 1. A tömegspektrometria kialakulásának rövid története

A tömegspektrometria kezdete Sir J. J. Thompson nevéhez fűződik, aki elektromosan töltött gázok vizsgálata közben felfedezte az elektront 1897-ben a Cambridge-i Egyetemen¹. Az 1900-as évek elején elhatározta, hogy megépíti az első tömegspektrométert, célja az ionok tömeg/töltés értékének meghatározása volt. A készülékben az ionokat kisülési csövekben állították elő, majd elektromos és mágneses térbe kerültek, ahol parabolikus pályára kényszerültek. A detektálás fotólemez segítségével vagy fluoreszcenciásan történt.

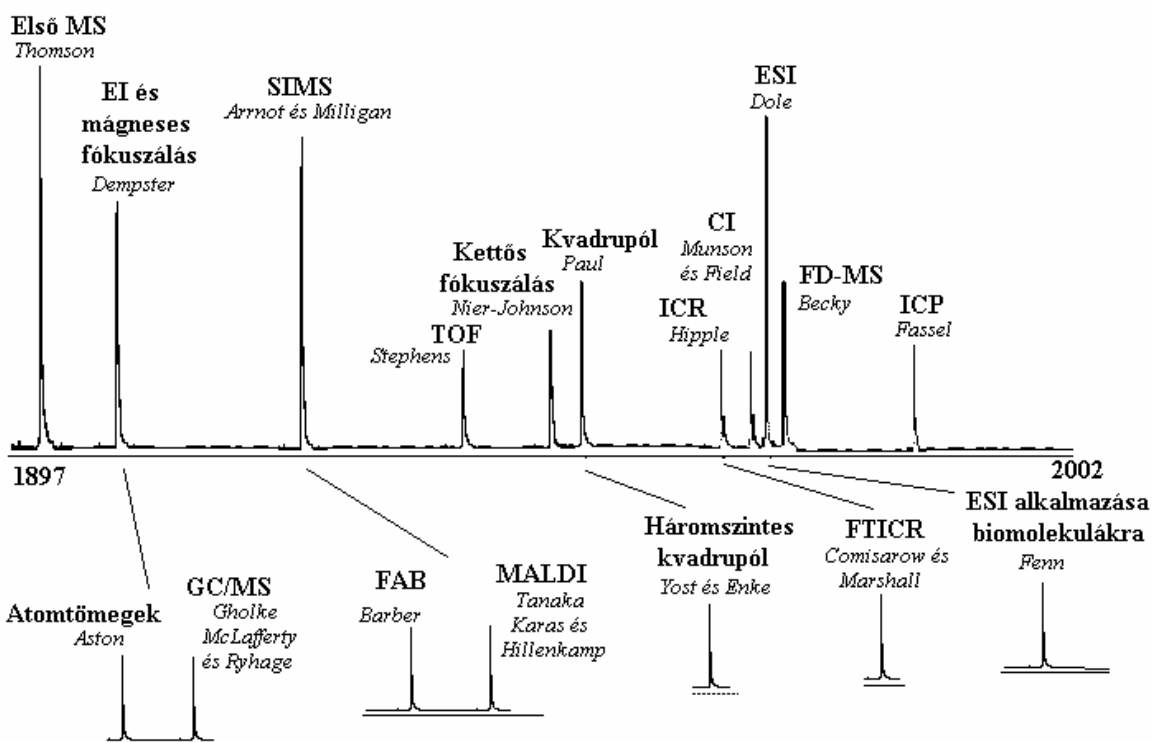
Thompson munkatársa Francis W. Aston volt, aki olyan tömegspektrométert épített, amely az ionokat tömegeik szerint szétválogatta, és sebességük szerint fókuszálta. A készülék egy nagyságrenddel jobb felbontásra volt képes, mint a Thompson által tervezett tömegspektrométer. Aston nevéhez fűződik a „tömegspektrum” kifejezés bevezetése, 1922-ben kémiai Nobel díjat kapott izotópok vizsgálatáért, amelyet az általa tervezett készülékkel végzett².

Egy másik az úgynevezett szektor-típusú berendezés az 1940-es években vált nagy jelentőségűvé, amelynek a kifejlesztése Alfred O. C. Neir nevéhez fűződik, aki a Minesotai Egyetemen dolgozott. A tömegspektrometria segítségével ő izolált először plutóniumot, illetve szektor típusú MS készülékével ²³⁵U izotópot különített el az első atombomba előállításához.

A munkám során használt MS készülékek TOF (Time of Flight) analizátorral vannak felszerelve, ezt először 1946-ban W. I. Stephens alkotta meg, később W. C. Wiley és I. H. McLaren tovább fejlesztette, nevükhöz fűződik az első TOF analizátorral felszerelt készülék.

A világháborút követően számos cégnél lehetett MS készüléket vásárolni, a piacvezető országok Anglia, USA és Németország lettek (amely tulajdonképpen ma is fennáll). A felbontás javítása érdekében megjelentek az úgynevezett kettős fókuszálású készülékek, amelyek létrejöttét az izotópok és a pontos atomtömegek meghatározása generálta.

A tömegspektrometria időbeli fejlődését az **1. ábra** szemlélteti³.



1. ábra
A tömegspektrometria fejlődése

II. 2. A tömegspektrométerek felépítése és működése

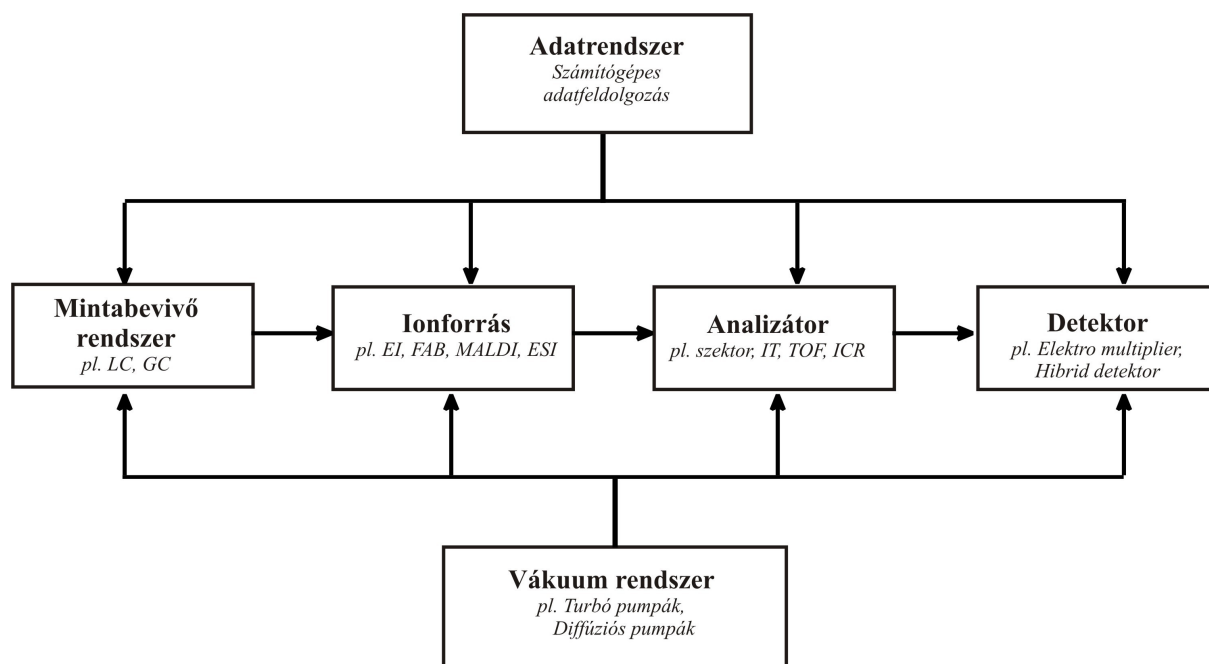
II. 2.1. Mintabevitel

A tömegspektrometria alkalmas bármilyen halmazállapotú anyag vizsgálatára. A megfelelő ionizációs technikával a legkülönbözőbb szerkezetű anyagok (legyenek egy vagy több komponensűek) nagy érzékenységgel és szelektivitással vizsgálhatóak.

A tiszta vegyületet (pl. standard anyag) közvetlen-mintabevitellel juttathatjuk az ionforrásba, míg többkomponensű rendszer esetén általában valamilyen kromatográfias technikára van szükség a komponensek szétválasztásához.

Fontos szempont minden mintabeviteli eljárásnál, hogy a minta bevitele során a vákuum ne romoljon le. Ez egyrészt azért jelentős, mert ennek következtében az érzékenység és az ionizáció hatékonysága nagy mértékben lecsökkenhet, valamint nagyfeszültséget alkalmazó készülékeknél elektromos kisülések következhetnek be, ami a tömegspektrométer károsodásához vezethet. Ezért nagyon fontos például GC-MS technikánál a vivőgáz eltávolítása.

A tömegspektrométerek általános felépítése a **2. ábrán** látható.



2. ábra

A tömegspektrométer felépítésének blokkdiagramja

II. 2.2. Ionforrások

A tömegspektrometria a molekulák (atomok) ionizációján, majd a képződött ionok relatív tömegének, pontosabban tömeg/töltés (m/z) hányadosának meghatározásán alapul. Vagyis fontos a vizsgálandó komponens minél hatékonyabb ionizációja. A megfelelő ionizációs technika megválasztása nagyon fontos, és a vizsgálandó anyag tulajdonságaitól és szerkezetétől függ. Az ionizációhoz általában nagyobb energiát alkalmazunk, mint ami az adott ion képződéséhez szükséges. Az ionizációs módszerek lehetnek közvetlenek vagy közvetettek. A közvetlen módszereknél nagysebességű elektronokkal vagy fotonokkal (pl. elektron ionizáció), a közvetett módszerek esetében töltött vagy semleges részecskékkel történő reakcióban, töltéscsere folyamatokkal váltjuk ki az ionizációt.

Számos ionizációs technika létezik, melyek részletes tárgyalása meghaladja ezen disszertáció lehetőségeit, így részletesen csak az általam használt módszereket mutatom be. Az egyik legrégebbi, de ma is a legáltalánosabban használt ionizációs technika az *elektron ionizáció*^{4,5}. A módszert nagy vákuumban végzik, melynek során nagy sebességű elektronok hatnak kölcsön gázfázisban lévő molekulákkal, ennek eredményeképpen pozitív és/vagy negatív töltésű gyökkationok/gyökionok keletkeznek. Hátránya azonban az, hogy a technika meglehetősen „hard”, ami nagymértékű fragmentációt okoz, a vizsgált molekulaion

gyakran meg sem jelenik a tömegspektrumban. Ennek elkerülése végett fejlesztették ki az úgynevezett „soft” ionizációs módszereket, amelyek lágy ionizációt tesznek lehetővé, így a molekulaion, illetve kvázi molekulaion is megjelenik a spektrumban. Ezek az eljárások három nagy csoportra oszthatók:

➤ Részecskeütközésen alapuló módszerek:

- 1) kémiai ionizáció (CI)⁶⁻⁸: az ionizáció a gázfázisba juttatott molekulák és a reagens gáz ionjai között lejátszódó reakció eredményeként jön létre. Előnye, hogy pozitív és negatív módban is használható;
- 2) szekunderion tömegspektrometria (SIMS): a mintát sík felületen helyezik el, amely általában fém, és néhány keV energiájú primerion vagy semleges részecske nyalábbal bombázzák;
- 3) gyors atomütköztetés (FAB)⁹⁻¹²: a mintát egy folyadék halmazállapotú mátrixanyagban homogenizálják, és ezt nagy energiájú neutrális részecskenyalábbal bombázzák;
- 4) plazma deszorpció (PD)¹³.

➤ Párolgáson/porlasztáson alapuló eljárások:

- 1) atmoszférikus nyomású kémiai (APCI)¹⁴⁻¹⁸ és fotoionizáció (APPI)¹⁹: az első esetben egy elektród segítségével korona kisüléseket hoznak létre, melynek hatására az oldószer molekulák ionizálódnak és a közöttük lejátszódó ütközés és töltéscsere folyamatok révén ionizációs gázplazma jön létre, amely protonálja az áthaladó mintamolekulákat, az utóbbinál az ionizációt UV fény segítségével váltjuk ki;
- 2) térionizáció (FI)¹³;
- 3) térdeszorpció (FD)¹³;
- 4) termospray (TS)²⁰ és elektropray (ES)²¹.

➤ Lézerdeszorpciós módszerek: ezek közül a technikák közül a MALDI a legfontosabb²².

II. 2.3. Tömeganalizátorok

A tömegspektrometriában a tömeganalízis a tömeg/töltés (m/z) hányados meghatározását jelenti. A tömeganalizátorok az ionokat szétválasztják m/z hányadosuknak megfelelően, majd ezeket az ionokat a detektorra fókuszálják. A megfelelő tömeganalizátor kiválasztása nagyon fontos, amelyet leginkább az elvárások (felbontás, tömegpontosság, érzékenység) és a lehetőségek (költségek) befolyásolnak²³. Az ionok elválasztása kétféle módon történhet, vagy iontranszport, vagy iontárolás alapján. Időben előbb az iontranszport módszerek jelentek meg, amelyek a következő főbb típusokra oszthatók:

- kvadrupól analizátorok: az analizátor 4 szimmetrikusan elhelyezett kör vagy hiperbolikus keresztmetszetű rúdból áll, amelyekre egyenáramot, illetve nagy frekvenciás váltakozó áramot kapcsolnak^{24,25}.
- szektor típusú analizátorok: a legrégebbi típusú analizátorokhoz tartoznak, szerkezetkutatási és analitikai célokra jó érzékenységük és felbontásuk, valamint széles tömegtartományban történő alkalmazhatóságuk miatt egyaránt használhatóak. Az ionokat mágneses, vagy mágneses és elektromos terek alkalmazásával lehet szétválasztani.
- és repülési idő analizátorok (Time of Flight, TOF)²⁶.

Az iontárolás alapján működő analizátorok később jelentek meg, közülük tartozik az:

- ionciklotron rezonancia (ICR): ennél az analizátor típusnál az ionokra egyidejűleg rádiófrekvenciás elektromos tér és állandó mágneses tér is hat, ennek következtében az ionok spirális pályára kényszerülnek. A rádiófrekvencia, illetve a mágneses tér változtatásával az ionok egymást követően detektálhatók²⁷.
- és a kvadrupól ioncsapda (iontrap, IT): a kvadrupól ioncsapda lényegében egy önmagába körbehajlított lineáris kvadrupól rúdrendszer. Három hengeresen szimmetrikus elektródból áll: egy gyűrűből és két lezáró sapkából. Így a csapda belsejében háromdimenziós kvadrupólus tér alakul ki, ami az ionokat nyolcas alakú pályára kényszeríti^{28,29}.

Egy analizátor több fontos paraméterrel jellemezhető: a felső tömeghatár értéke, a felbontása és a transzmissziója (a detektort elérő és a forrásban képződött ionszám hányados), a tömegpontosság, az érzékenység és a lineáris dinamikus tartomány.

II. 2.4. Detektorok, jelfeldolgozás

A tömegspektrum tulajdonképpen a megjelenített ionszámot, ionmennyiséget ábrázolja az m/z függvényében, így a detektor feladata az analizátor által m/z értékek alapján szétválasztott ionok összegyűjtése, és a számukkal arányos elektromos jel képzése³⁰. A detektorokat öt összefüggő paraméterrel lehet jellemezni: az érzékenységgel, az elektromos zajszintjükkel, az ionáram változás követésének sebességével, a stabilitásukkal és az erősítési tényezőjükkel. Ma már kizárólag az ionáram időbeni változását is követni tudó detektorokat alkalmaznak. Két csoportra oszthatóak: pontdetektorok és sordetektorok. A pontdetektorok esetében az ionok egymást követően érik el a detektor ugyanazon pontját, míg sordetektorok esetén az analizátor leképzési síkjában elhelyezett detektorsort valamennyi ion egyszerre éri el. Ennek megfelelően, pl. ioncsapda analizátornál csak pontdetektor használható, mivel ezek időtartományban érkező ionokat detektálnak. Pontdetektorként általában elektronsokszorozókat (elektron multiplier) alkalmaznak, amelyek szekunder elektron emisszió alapulnak³¹⁻³³. A sokszorozó felülete lehet diszkrét (dinódarendszer) vagy folytonos (chaneltron). A dinóda rendszerű sokszorozónál a fókuszált ionnyaláb egy átalakító dinódára érkezik, melyből elektronok lépnek ki. Az elektronok beleütköznek a következő lemezfelületbe, amelyből további elektronokat löknek, s így lavinaszerűen sokszorozott elektronáramot kapunk. Ebben az esetben a detektor élettartama nem túl hosszú, mivel az első lemez hamar (kb. 2 év) elszennyeződik, és ezáltal érzékenységük jelentősen lecsökken, a zajszint megnő. A folytonos felületű elektronsokszorozók egy speciális fajtája az úgynevezett chaneltron, amely változó alakú formájának köszönhetően megakadályozza a szekunder elektronok visszaszóródását, ezáltal csökkentve az elektromos zajt.

Az utóbbi évtizedben jelentek meg a Daly-féle iondetektorok, melyben az ionok a nagyfeszültségen lévő konverziós dinódába ütközve, abból elektronokat szakítanak ki, melyek a szcintillátorból fotonemissziót indukálnak³⁴⁻³⁷. A szcintillátor általában egy foszforkorong, az emittált fotonokat foton-multiplierrel alakíthatjuk elektromos árammá. Ezeknek a detektoroknak a hatásfoka egy-két nagyságrenddel nagyobb, mint az elektronsokszorozóké, valamint az élettartamuk is hosszabb.

A TOF berendezésekben, illetve a drágább mágneses készülékekben az utóbbi időben jelentek meg a sor (array) detektorok. Ez a mágnes fókusz síkjában elhelyezett nagyobb számú iondetektorból áll, ami lehetővé teszi a térben szétválasztott ionok azonos időben történő detektálását. TOF analizátorok esetén rendszerint mikrocsatornasor detektorokat (microchannel plate) alkalmazunk^{38,39}. Az időben szeparált különböző m/z értékű ionok a mikrocsatornasor felé mozognak, ahol a csatornák belső felülete félvezető anyaggal van

bevonva. A detektor üvegkapillárisok sorozatából áll, amelynek a belső fala elektron emisszióra képes anyaggal borított. Amikor egy ionsoport mindegyik ionja beleütközik egy mikrosatorna belső felületébe, akkor onnan elektronokat szakít ki megindítva ezzel a lavinaszerű szekunder ionáramot. Ezt az ionáramot egy fémlemez gyűjti össze, amely a mikrosatornasor végénél helyezkedik el. A lemeztől elfolyó áram detektálható, így ez a detektor érzékeli tudja valamennyi ion érkezési idejét. Ma már a jelek feldolgozása gyakorlatilag minden esetben számítógépek segítségével történik. A számítástechnikai előnyök mellett lehetőségünk van a háttérzaj csökkentésére, mivel a számítógép csak az általunk megadott, úgynevezett „threshold” értéknél (küszöbérték) nagyobb jeleket dolgozza fel. Ehhez azonban a primer analóg jelet egy konverter segítségével (analóg digitális konverter) digitális jellé kell alakítanunk⁴⁰. A jelfeldolgozás egyik fontos tényezője a jelkonverzió frekvenciája, vagyis a mintavétel gyakorisága. A számítógéppel történő jelfeldolgozás nagyon kényelmes, gyors, precíz tömegspektrumok felvételét teszi lehetővé.

II. 2.5. Tandem tömegspektrometria (MS/MS)

A szerves vegyületek tömegspektrumaiban megjelenő ionokat több szempont szerint csoportosíthatjuk. Megkülönböztetünk egyszeres vagy többszörös töltésű pozitív, illetve negatív ionokat, melyek lehetnek molekulaionok, kvázi molekulaionok, adduktok vagy ezekből kötés-hasadással, átrendeződéssel képződött fragmens ionok. A tandem vagy hibrid tömegspektrométerek egyidejűleg alkalmasak az ionok elválasztására és azonosítására. A prekursor iont először tömeg szerint kiválasztjuk, majd ütközés kiváltotta disszociációval (CID) fragmentáljuk, és az így képződött ionok tömeganalízisét végezzük el⁴¹⁻⁴⁶. Ezt természetesen csak akkor végezhetjük el, ha a készülék két tömeganalizátorral rendelkezik, vagy pedig olyan speciális analizátorral van felszerelve, amelyet szekvenciálisan is lehet működtetni. A tandem tömegspektrometria segítségével olyan fontos szerkezeti információkhoz juthatunk, amelyekhez egy egyszerű tömegspektrumból nem. Ilyen lehet, pl. két konstitúciós izomer megkülönböztetése fragmentáció alapján. A tandem MS kapcsolatot teremt a prekursor ion és a belőle képződött fragmens ionok között. A CID eljárást a 60-as évek végén Keith R. Jennings vezette be. A később megjelenő lágy ionizációs módszerek (pl. MALDI, ESI) és a tandem MS együttes alkalmazása jelentősen megnövelte annak népszerűségét. Manapság az úgynevezett hármas kvadrupóllal rendelkező tömegspektrométerek a legelterjedtebbek, de vannak kettős vagy vegyes analizátorral felszerelt készülékek is, pl. TOF-TOF, QTOF, ahol egy kvadrupól és egy repülési idő analizátor van egybeépítve. Az analizátorok számától függően MSⁿ mérésekre van lehetőség.

Fragmentáció vizsgálatára leggyakrabban az MS² és MS³ méréseket alkalmazzák. Az MS² vagy MS/MS mérés során az egyik analizátornak a vizsgált addukt ion, vagy molekulaion kiválasztásában van szerepe. Bár itt a tömegpontosságának kisebb szerepe van, mégis a nagyobb pontosságú analizátorral kisebb tömegtartományt lehet kiválasztani. Ennek akkor van nagy jelentősége, ha a vizsgálni kívánt csúcs közelében valami más anyag, szennyező is megjelenik a spektrumban. Ekkor ugyanis, ha a kiválasztott tömegablakba több csúcs is belesik, akkor a megjelenő termék ionok nem biztos, hogy csak a vizsgálni kívánt molekulától származnak, így megnehezítik az azonosítást. A kiválasztott molekulával valamilyen módon (pl. gázmolekulákkal való ütközések révén) energiát közlünk, és a keletkező termék ionokat a második analizátorral választjuk szét. Itt a tömegpontosságának nagy szerepe lehet, hiszen kisebb pontosságnál, egy ismeretlen molekula esetében, pl. a N₂ és CO vagy az acetaldehid és CO₂ kihatást nem lehet megkülönböztetni. Az MS³ mérések során a második analizátorral ki lehet választani és tovább fragmentálni egy termék iont, amely a fragmentációs mechanizmus felderítésében nyújthat segítséget.

II. 3. A MALDI-TOF tömegspektrometria

II. 3.1. A MALDI-TOF MS elve

A MALDI egy mozaik szó, az angol *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* rövidítése, magyarul mátrix segített lézer deszorpciónak/ionizációnak nevezik. A módszer a 70-es években kifejlesztett LD-MS egyik változata. Ha a lézer deszorpció során nem használunk mátrixot, akkor a módszer nem tekinthető lágy ionizációnak, hiszen a mintával olyan nagy energiát közlünk, amely disszociációt eredményez, így a tömegspektrumban csak a mintából származó fragmens ionokat látjuk. Hátránya továbbá ennek a technikának az, hogy a lézer impulzust követően az ionképződés időtartama rövid. A MALDI az 1980-as években került kifejlesztésre, amikor bebizonyosodott, hogy kis mennyiségű szerves anyag mintához való hozzáadásával, a lézerrel besugárzott minta nem szenved disszociációt⁴⁷⁻⁵⁰. A hozzáadott segédanyagot mátrixnak nevezzük. A módszer alkalmazásával csekély mértékű fragmentáció következik be, így a kvázi-molekulaionok analízisére is lehetőség van. Tanaka és munkatársai, valamint tőlük függetlenül Hillenkamp és kutatócsoportja 1988-ban tették közé a MALDI technika elvi alapjait.

Ez az ionizációs technika nagyon jól alkalmazható nagy molekulatömegű anyagok vizsgálatára, pl. fehérjék, szénhidrátok^{51,52}, valamint különböző szintetikus polimerek analízisére, pl. poli(etilén-glikol) származékok^{53,54}. Vizsgáltak már vele az iparban is használt

poláris és apoláris polimer származékokat, pl. politejsav⁵⁵, poliuretánok⁵⁶, poli(propilén-glikol)⁵⁷, polisztirol⁵⁸⁻⁶⁰, poli(metil-metakrilát)⁶¹⁻⁶⁴. Tömegtartományt tekintve a MALDI technika inkább a nagyobb molekulatömegekre használatos, a kisebb molekulatömegek esetében főleg a 400-500 Da alatti molekulák esetében a minta azonosítását nagymértékben zavarhatja az úgynevezett mátrix tartomány. Ebben a tartományban a mátrix és a mátrix, valamint a minta fragmens ionjai jelennek meg. Néhány esetben kis molekulatömegű anyagok mérésére használják az LDI technikát, ami tulajdonképpen mátrix nélküli lézer deszorpciót jelent, ekkor kiküszöbölik a mátrixból eredő csúcsokat, de a vizsgálandó minta nagyobb mértékben fragmentálódhat.

Fontos a módszernél, hogy milyen mintához milyen mátrixot használunk, és ezeket milyen arányban keverjük össze. Ma már a legkülönbélebb mátrixokat használják, amelyek a legtöbb esetben kis molekulatömegű szerves molekulák. Több fontos követelmény is van, amelynek a mátrix meg kell, hogy feleljen: a lézer hullámhosszán nyeljen el (a lézer általában nitrogén gázlézer, $\lambda = 337$ nm, ritkábban a drágább Nd-YAG lézer, $\lambda = 355$ és 266 nm), stabil molekula legyen, a mintával ne lépjen reakcióba, jól kristályosodjon. Néhány alkalmazott mátrix: 2,5-dihidroxi-benzoészav (DHB), 1,8,9-trihidroxi-antracén (Ditranol), szinapiksav. A rövid ideig alkalmazott nagy intenzitású lézerimpulzus következtében a mátrix gerjesztődik, és a minta molekulákkal együtt gázfázisba kerül, az elnyelt energia a minta deszorpcióját és fragmentáció nélküli ionizációját eredményezi. Az ionok impulzusszerűen képződnek, majd egy rövid – 1-2 cm hosszú – gyorsító szakaszon elektromos tér hatására felgyorsulnak. Az ionizáció elméleti alapjai körül ma is folynak kutatások, elsősorban biológiai tudományok terén gyors a fejlődés, a technológiai fejlesztések kisebb figyelmet kapnak.

A makromolekulák deszorpciójára több elképzelés látott napvilágot. Az egyik modell a mátrix molekulák felületről történő szublimációját a kis lézerintenzitások esetén kialakuló helyi felmelegedéssel magyarázza. A kristályt összetartó hidrogénhidakon keresztül csatolódnak a mátrix molekulák belső rezgése a makromolekulák vibrációs módusaihoz. Ez a csatolás azonban gyenge a jelentős frekvenciakülönbségek miatt, ennek következtében a makromolekulák viszonylag kicsi belső energiával lépnek át a gázfázisba, így elkerülik a fragmentációt⁶⁵. Egy másik elmélet szerint nyomás gradiens kialakulásával kell számolnunk, ami a makromolekulák felületről történő deszorpcióját felgyorsítja a gyorsan mozgó mátrix molekulákkal való ütközések következtében lejátszódó momentum transzfer miatt⁶⁶.

A MALDI ionizáció pontos mechanizmusa körül ma is viták folynak⁶⁷, de valószínűleg a következő általános elvek alapján értelmezhető:

- A mátrix a lézer hullámhosszán nyel el, így az elnyelt fotonok hatására vibrációs gerjesztést szenved, ezzel helyileg szétrázza a szilárd fázist. Ennek következtében gerjesztett és semleges mátrix molekulával körülvevett klaszterek képződnek, amelyek egy mintamolekulát tartalmaznak klaszterenként. A mátrix molekulák elpárolgása után a klaszterből csak a gerjesztett minta molekulája marad vissza.
- A minta molekulái a mátrixban tökéletesen szét vannak osztva, vagyis teljesen egymástól külön helyezkednek el. Ez úgy történik, hogy az oldószer elpárolgása után a mátrix homogén „szilárd oldatot” hoz létre.
- A mintamolekulák ionizálódhatnak a gerjesztett mátrix okozta kationizációval, ami az $[M+C]^+$ addukt ionokhoz vezet, ahol $C = H, Na, K, \text{ stb.}$ E mellett képződhetnek többszörös töltésű származékok, dimerek is. Negatív ionok deprotonálódás révén képződhetnek $[M-H]^-$ szerkezet képződése mellett, illetve gyök molekulaion kialakulásával $[M]^\bullet$, vagyis a minta ionizációját különböző ionizáló ágensek alkalmazásával befolyásolni lehet. Leggyakrabban az ionizáló kation maga a proton, de alkalmazhatunk soft és hard kationokkal képzett sókat is. Ha a molekula poláris, illetve donor atomokat tartalmaz, pl. oxigén, nitrogén, kén, akkor a molekulát protonnal vagy hard jellegű fémionokkal könnyebb ionizálni (pl. poli(etilén-glikol) nátriummal vagy káliummal kiválóan ionizálható). Ha a molekula apoláris, akkor az ionizációt soft kationokkal érhetjük el (pl. poliizobutilén ezüstionokkal jól ionizálható).

Kisebb molekulatömegű anyagok esetén MALDI ionizáció során általában csak egyszeres töltésű ionok képződnek. A többszörös töltésű ionok, illetve dimerek főként a nagyobb molekulatömegű anyagokra jellemzőek, pl. fehérjék, peptidek. A képződött ionokat repülési idő analízátorral választjuk szét, majd m/z szerint detektáljuk. A MALDI készülékek általában TOF analízátorral vannak felszerelve.

II. 3.2. A repülési idő (TOF) analízátor működése

Az első TOF MS készüléket a BENDIX cég (USA) hozta forgalomba, azonban ezek a készülékek a rövid időkülönbséget mérő mikroáramkörök hiánya miatt nem voltak túl sikeresek. A repülési idő analízátor lényegében az ionokat repülési idejük alapján választja szét. Kezdetben ezen készülékek felbontása még az egyszeres fókuszálású mágneses készülékek felbontását sem érte el. A technika fejlődésével és két alapvető módosítás bevezetésével jelentős javulást sikerült elérni a felbontásban. Az egyik az úgynevezett

késleltetett ion extrakció (delayed extraction, DE) alkalmazása volt, ami a kezdeti kinetikus energia eloszlását minimalizálta⁶⁸. A másik a Boris A. Mamyrin által kifejlesztett iontükör bevezetése volt, amely tovább szűkítette az ionok kinetikus energiájának eloszlását⁶⁹. Napjainkban a TOF analizátorok felbontása vetekszik a legmodernebb kettős fókuszálású tömeganalizátorokéval is.

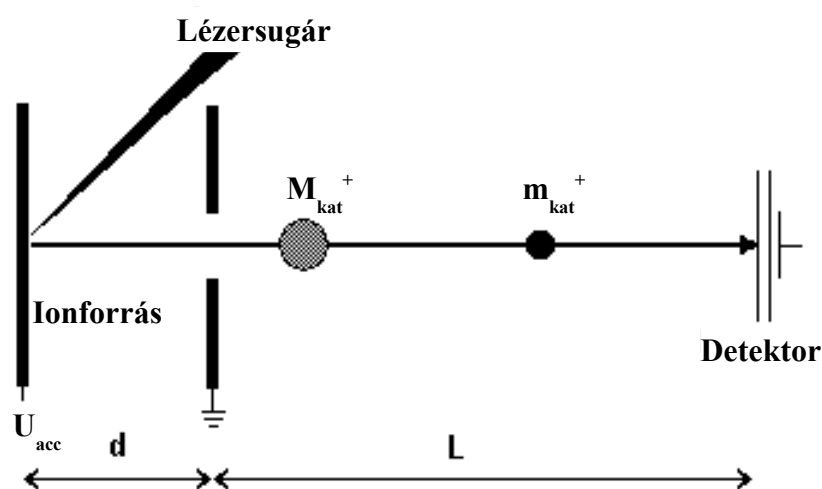
A pulzáló elven működő ionforrásokhoz, mint amilyen a MALDI is, a TOF analizátor a legmegfelelőbb^{70,71}, mivel ezeknél az ionforrásoknál a pontosan meghatározott időben keletkező ionsomagok összes ionját a TOF analizátor kvázi egyidőben képes regisztrálni. A kapott ionok 1-2 cm távolságon 20-30 kV gyorsító feszültséggel gyorsulnak, majd ezt követően 1-2 m hosszú repülési csőben „szabadon” repülnek. A lineáris TOF analizátor elvi működési rajza a **3. ábrán** látható, ahol

d = az a távolság, amíg a részecske gyorsul (gyorsító szakasz)

L = a szabad repülési úthossz

M_{kat}^+ és m_{kat}^+ = a képződött kationok tömege, $M_{kat}^+ > m_{kat}^+$

U_{acc} = gyorsító feszültség



3. ábra

A lineáris TOF analizátor elvi működési rajza

Az E_{kin} kinetikus energiával rendelkező ionra a következő összefüggés írható fel:

$$E_{kin} = U_{acc} \cdot z \cdot e = \frac{1}{2}mv^2 \quad (1)$$

ahol, m az ion tömege, z az ion töltésszáma, e az elektron töltése, v az ion sebessége, és U_{acc} a gyorsító feszültség.

Az (1) egyenletből az ion sebessége kifejezhető:

$$v = \sqrt{\frac{2U_{\text{acc}} \cdot e \cdot z}{m}} \quad (2)$$

Ha feltételezzük, hogy a kezdeti sebesség 0, akkor a gyorsító szakaszban töltött idő (t_d) és a repülési csőben töltött idő (t_L) a következőképpen számolható:

$$t_d = \frac{2d}{v} = 2d \sqrt{\frac{m}{2U_{\text{acc}} \cdot e \cdot z}} \quad (3)$$

$$t_L = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2U_{\text{acc}} \cdot e \cdot z}} \quad (4)$$

A két idő összegéből megkaphatjuk a teljes repülési időt, azaz a lézer impulzustól a detektálásig eltelt időt (t_{TOF}):

$$t_{\text{TOF}} = t_d + t_L = (2d + L) \sqrt{\frac{m}{2U_{\text{acc}} \cdot e \cdot z}} \quad (5)$$

Az 5. egyenlet átalakításával a következő összefüggést kapjuk:

$$\sqrt{m} = \frac{\sqrt{2U_{\text{acc}} \cdot e \cdot z}}{2d + L} \cdot t_{\text{TOF}} \quad (6)$$

Ha a 6. egyenlet mindkét oldalát elosztjuk \sqrt{z} -vel, és a t_{TOF} előtt szereplő tényezőt A -val jelöljük, mivel az konstans, akkor a következő összefüggéshez jutunk:

$$\sqrt{\frac{m}{z}} = A \cdot t_{\text{TOF}} \quad (7)$$

vagyis

$$\frac{m}{z} = A' \cdot t_{\text{TOF}}^2 \quad (8)$$

A 8. egyenletből látható, hogy az m/z érték a repülési idővel négyzetesen arányos. Reális körülmények között nem teljesül az a feltétel, hogy az ion kezdeti sebessége nulla, ez jelszélesedéshez, így a felbontás romlásához vezet.

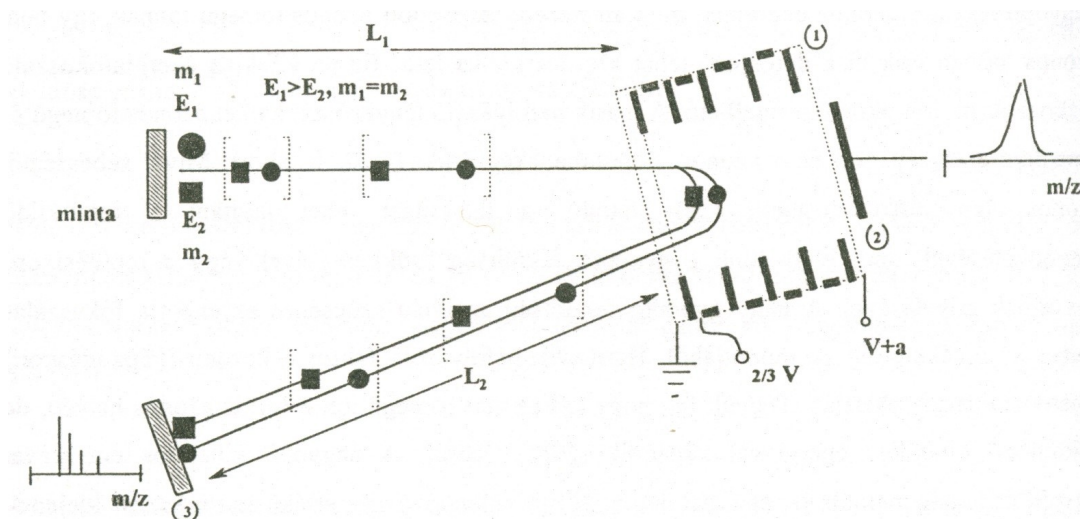
A tömegspektrométert hasonlóan más készülékekhez kalibrálni kell. A kalibrálás ismert tömegű standard anyagokkal történik, attól függően, hogy milyen tömegtartományban kívánunk dolgozni.

Kimutathatósági alsó határa elvben nincs, a gyakorlatban pedig leginkább a vizsgált minta anyagi minőségétől, a készülék paramétereitől és a minta előkészítésétől függ. Az érzékenység a MALDI esetében leginkább úgy fejezhető ki, hogy mi az a legkisebb mennyiség, amit a mintatartó lemezre felcseppentve, még értékelhető spektrumot kapunk. A koncentrációtartomány könnyen kiszámítható: attomol MALDI érzékenység, pl. pikomol koncentrációra utal. A TOF tömeganalizátor érzékenysége általában pikomol és femtomol közötti tömegtartományban van.

II. 3.3. Delayed extraction és reflekttron

Az említett jelszélesedés kiküszöbölésére két alapvető újítást vezettek be. A jelszélesedés több okból következik be. Az egyik, hogy az ionok kezdeti sebessége nem egyforma (Maxwell-Boltzmann eloszlás), így gyorsítás után az azonos tömegű ionoknak is különböző lehet a sebessége. Másrészt az ionképződés helye is eltérő lehet. Ezeknek a hatásoknak a kiküszöbölését úgy oldották meg, hogy a feszültséget kicsivel később, egy úgynevezett τ időpillanatban kapcsolták az ionforrásra. Mivel eddig a pillanatig a tér potenciálmentes, azok az ionok, amelyek nagyobb kinetikus energiájúak voltak nagyobb utat, míg a kisebb kinetikus energiájúak kisebb utat tesznek meg. Ezáltal a gyorsabb ionok kisebb, a lassabb ionok nagyobb szakaszon gyorsulnak, így az ionok fókuszálódnak mielőtt elhagynák a gyorsító szakaszt.

A módszert először W. C. Wiley és I. H. McLaren fejlesztett ki és „Time Lag Focusing”-nak (TLF) nevezték el⁶⁸. Napjainkban ugyanerre a jelenségre a műszergyártók különféle elnevezéseket használnak, pl. „delayed extraction” (DE), „pulse ion extraction” (PIE), „dynamic extraction” (DE)⁷²⁻⁷⁸. Ennek bevezetésével a felbontás jelentősen javult, de volt egy másik technikai újítás is, amely a felbontást tovább javította. Ez a reflekttron alkalmazása volt, amelynek kifejlesztése egy orosz tudós B. A. Mamyrin nevéhez fűződik⁵⁵. A Mamyrin-féle reflekttron vázlatát a **4. ábrán** látható.



4. ábra

A Mamyrin-féle reflektoron vázlata

A reflektoron (szokás iontükörnek is nevezni) a repülési cső végén helyezkedik el, fémgyűrűkből áll, amelyekre különböző feszültség van kapcsolva. Azok az ionok, amelyek azonos tömegűek, de különböző sebességűek különböző mértékben „süllyednek bele” a reflektoronra kapcsolt elektrosztatikus térbe. Ezáltal a nagyobb sebességűek nagyobb utat tesznek meg, így a repülési idő kompenzálódik, és nagymértékben javul a felbontás, valamint a repülési út is megnő.

Ezen két újítás segítségével a mai MALDI-TOF készülékekkel nagyon jó felbontást lehet elérni.

II. 3.4. Mintaelőkészítés

A korábbiakban már említettem, hogy MALDI technika esetén fontos szerepe van a mátrix és a vizsgálandó minta arányának. Ez az arány mólarányt jelent és általában a mátrix 100-10000-szeres mólfeszleslegben van jelen. A mintapreparációnak több módja is létezik. A mátrixból és a mintából készíthetünk külön oldatot, és ezeket az oldatokat keverjük össze a megfelelő arányban, majd a kapott keverékből 0,2-1,5 μl -t cseppentünk fel a mintatartó lemezre (target), amelynek anyaga általában (dryed-droplet) saválló acél. A mátrixot és a mintát külön-külön is fel lehet vinni a targetre, pl. felcseppentjük a mátrixot, majd beszáradás után rácseppentjük a mintát, és erre az egészre még egyszer rácseppenthetjük a mátrixot. A mérés előtt mindenképpen meg kell várni, hogy az oldószer elpárologjon, és úgynevezett „szilárd oldatot” kapjunk. A mintaelőkészítés során használhatunk szilárd⁷⁹ és folyadék⁸⁰⁻⁸⁵ állapotú mátrixokat is. A minta és a mátrix arányán kívül más is befolyásolja a megfelelő

mintaelőkészítést, pl. a kristályosítási eljárás. Néhány fontosabb kristályosítási eljárás: „sandwich”⁸⁶, „electrospray”⁸⁷⁻⁹⁰, „matrix protected target”⁹¹, „vacuum-drying”^{92,93}, „overlayer”⁹⁴⁻⁹⁶, „crushed-crystal”^{97,98}, „spin-coating”⁹⁹, „slow crystallization”¹⁰⁰. A leggyakrabban alkalmazott mátrixok, pl. 2,5-dihidroxi-benzoésav (DHB), több szerves oldószerből is jól kikristályosodnak, azonban elképzelhető, hogy a jelintenzitásokban, vagyis az érzékenységekben jelentős különbségeket tapasztalunk. A megfelelő oldószer kiválasztása, a mátrixon túl, a vizsgálandó mintától is függ, és általában kísérletekkel, tapasztalatok útján választjuk ki a megfelelőt. Alapvető fontosságú, hogy a mátrixhoz is és a mintához is találjunk egy oldószer vagy oldószerkeletet, amelyben az teljesen feloldódik. Alkalmazzuk úgynevezett szilárd fázisú mintapreparációt is, amely nem igényel oldószer, ilyenkor a mátrix és a minta szilárd keverékét viszik fel a mintatartó lemezre.

Kristályosodás szempontjából jelentősége van az oldószer felületi feszültségének és illékonyságának is, a kis felületi feszültségű oldószer könnyen szétterülnek a mintatartó lemezen, ezáltal csökkentik az egységnyi felületre jutó kristályok mennyiségét. (Ma már vannak olyan mintatartó lemezek, amelyeken különleges felületi kialakításuknak köszönhetően gyakorlatilag semmilyen oldószer sem terül szét nagy felületen.) Az illékonyabb oldószer gyorsabb párolgása eredményeképpen kisebb, homogén eloszlású kristályok képződnek. Vannak olyan vegyületek, amelyeknek mintaelőkészítésére létezik általános recept, pl. szénhidrátok, fehérjék, azonban még ezekben az esetekben is előfordulhat, hogy az adott fehérje vizsgálatához ettől a recepttől eltérő egyedi mintaelőkészítés szükséges.

Az ionizáció elősegítésére a mátrix-minta keverékhez különböző ionizáló ágenseket adhatunk. Ezeknek a kiválasztása szintén döntő fontosságú lehet, általában a donatoromokkal rendelkező poláris anyagokat alkáli fém ionokkal, protonnal (hard ionok), az apoláris anyagokat, mint pl. polisztirol, inkább ezüst ionnal (szoft ionokkal) lehet jól ionizálni. Ha nem megfelelő kationnal próbálunk ionizálni egy mintát, akkor lehet, hogy semmilyen jelet sem kapunk (pl. az Olefin-telemeklikus poliizobutilént Na^+ -nal nem lehet ionizálni).

A mintaelőkészítés során nagyon fontos, hogy olyan mátrixot, oldószer és ionizálót használjunk, hogy a vizsgálandó minta ezek egyikével se lépjen reakcióba, szerkezete ne változzon meg.

II. 3.5. Különböző anyagok azonosítása MALDI technikával

A MALDI technika kiválóan alkalmas polimerek és nagyobb molekulatömegű anyagok vizsgálatára, karakterizálására, ugyanakkor kis molekulatömegű vegyületek is vizsgálhatóak vele. A nehézséget általában a MALDI-nál megjelenő mátrix tartomány (m/z 400-ig) okozza, amely nagyszámú, főleg a mátrixtól és fragmenseitől eredő csúcsot tartalmaz. A kis molekulatömegű anyagok ionizációja, MALDI technika esetén, addukt ionok megjelenését jelenti, amelyek általában alkálifém ionokkal vagy protonnal képződnek. Polimerek esetén lehetőségünk van az ismétlődő egység és a végcsoportok meghatározására. Természetesen a vizsgálandó minta tisztasága, főleg peptidek, fehérjék esetén, döntő fontosságú lehet. Csak olyan polimerek vizsgálhatók, amelyek szűk ($M_w/M_n < 1,2$) eloszlásúak, ezen polimerek esetében meghatározható az ismétlődő egység és a végcsoport mellett a számátlag-, a tömegátlag-molekulatömeg (M_n , M_w) és a polidiszperzitás (PD). Minden minta esetén a molekulatömeg kiszámolásához figyelembe kell venni, hogy az adott molekula milyen kationnal ionizálódott, így a következő összefüggés írható fel:

$$M_i = M_{kat} + M_{mol} \quad (9)$$

ahol, M_i a tömegspektrumban megjelenő tömeg, M_{kat} a kation tömege és M_{mol} a molekula valódi tömege.

Természetesen ez a képlet csak egyszeres töltésre igaz, de MALDI esetén általában ez az eset fordul elő.

Mint a mintaelőkészítésben is már megemlítettem fontos, hogy a vizsgálandó mintát teljes mértékben feloldjuk. Ellenkező esetben az is előfordulhat, hogy a mintáról, pl. csak a szennyezőanyag oldódik ki, így egész más tömegspektrumot kapunk, mint ami a mintára jellemző. A feloldás különösen polimerek esetében jelenthet problémát, mivel ezekre általánosságban igaz, hogy a molekulatömeg növekedésével az oldékonyságuk csökken.

II. 3.6. Fragmentáció MALDI technika esetén

Az előző pontban említett pontos tömeg meghatározás és karakterizálás mellett a módszer, pl. aminosavak szekvenciájának meghatározására is alkalmas. Bár lágyionizációs technikáról van szó, mégis a megfelelő beállításokkal képesek vagyunk fragmentáció vizsgálatára is. A szerves tömegspektrometriában ez mindig kicsit ellentmondásos volt, hiszen egyrészt szeretnénk a vizsgált mintát bomlásmentesen analizálni, másrészt bizonyos fontos szerkezeti információkhoz csak fragmentáció segítségével jutunk hozzá.

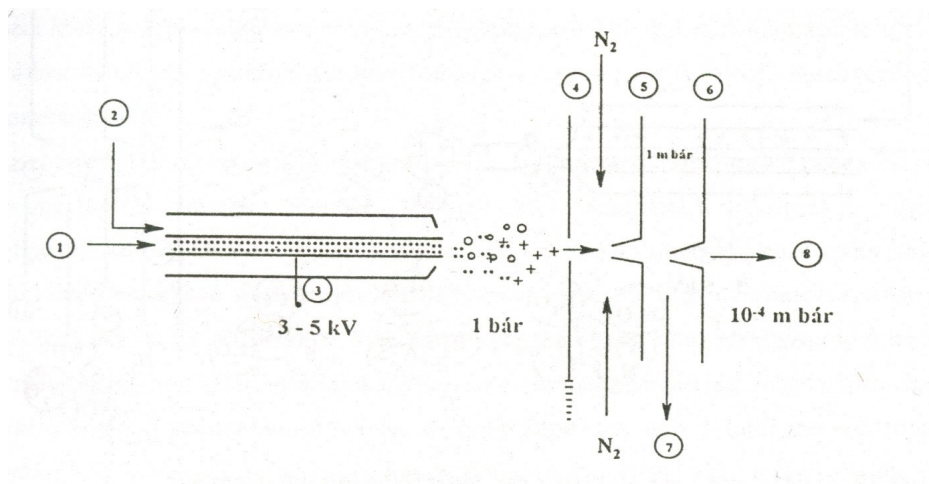
MALDI módszer esetén kétféle fragmentáció következhet be, ha ez a MALDI ionforrásban történik, akkor úgynevezett forrásban belüli bomlásról (**In-Source Decay**, **ISD**) beszélünk. Ennek a mértékét a közölt lézereenergia változtatásával, mátrix alkalmazásával lehet befolyásolni. Azonban ezt a bomlást kevés esetben tudjuk megfelelően hasznosítani, van azonban egy másik típusú fragmentáció is, amely nem az ionforrásban, hanem a repülési csőben következik be, ezt forrás utáni bomlásnak (**Post-Source Decay**, **PSD**) nevezzük¹⁰¹⁻¹⁰⁵. Ez a bomlás történhet a repülési csőben található N₂, O₂ molekulákkal történt ütközés következtében. A módszer során kiválasztunk egy tömegablakot, így a repülési csőbe csak azok az ionok kerülnek be, amelyek tömegei ebbe az ablakba esnek. A spektrumot úgynevezett szegmensekben (különböző tömegtartományokban) vesszük fel, és a mérés után illesztjük össze. A spektrumban a legnagyobb tömegnél a kiválasztott ion (prekurzor ion) jelenik meg, kisebb m/z értékeknél pedig a belőle származó termék ionok jelentkeznek. A technika kiválóan alkalmazható kis molekulák szerkezetének meghatározására, valamint elterjedten alkalmazzák, pl. peptidek szerkezetének, szekvenciájának felderítésére.

II. 4. Az ESI-TOF tömegspektrometria

II. 4.1. Az ESI-TOF tömegspektrometria alapjai

A módszert elvben már az 1960-as években kidolgozták, az első úttörő kísérleteket Malcom Dole és munkatársai végezték, de a megvalósítása technikai okok miatt az 1980-as évekig váratott magára. Makromolekulák elektropray technikával történő vizsgálatáért John B. Fenn 2002-ben Nobel-díjat kapott. Fennhez fűződik az ESI technika alapelveinek leírása, amellyel a termikusan instabil, nagyméretű biomolekulák, proteinek, fragmentáció nélkül ionizálhatók és vizsgálhatók.

Az elektroporlasztásos ionizációs technikánál a mintát atmoszférikus nyomáson, folyadékárammal juttatjuk az ionforrásba. Az ionok az atmoszférikus nyomású térben képződnek, s innen jutnak az analizátor nagyvákuumú terébe. A technikánál egy elektrosztatikus tér eredményezi az ionképződést, amely a porlasztó kapillárisra van kapcsolva. A kapilláris hegye és az ellenelektrod között elektrosztatikus tér jön létre, így a kapilláris végén lévő folyadék felszínén töltéstöbblet alakul ki, melynek hatására a kapillárisból kilépő folyadék kúpszerűen kicsúcsosodik (Taylor-kúp). Az ionforrás vázlata az **5. ábrán** látható.



5. ábra

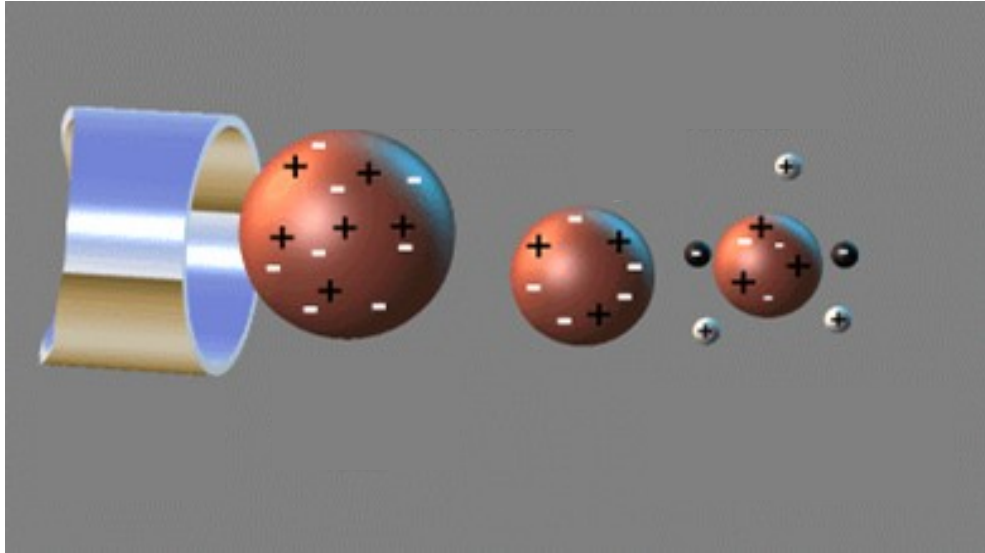
Az elektroporlasztásos ionforrás vázlata

1. folyadékáram; 2. spray képződését fokozó gáz (N₂); 3. fémkapilláris; 4. ellenelektrod; 5. belépő kúp; 6. leválasztó nyílás; 7. vákuumszivattyú; 8. analízátor

A porlasztás eredményeképpen töltött cseppek képződnek, melyekből az ionok képződésére két alapvető elmélet létezik. Az egyik elmélet az ionelpárolgási modell (Ion Evaporation Modell, IEM) (**6. ábra**), amely szerint a folyadékcseppek a fűtött tér hatására elkezdnek bepárolódni, azonban a csepp felületén lévő töltésmennyiség állandó marad, így a csepp méretének csökkenésével az azonos töltések egyre közelebb kerülnek egymáshoz, amikor a köztük lévő taszítóerő eléri a cseppet összetartó felületi feszültséget, akkor az szétrobban¹⁰⁶⁻¹¹¹. Ekkor képződnek a különböző töltéssel rendelkező gázfázisú ionok. Azt a határt, amikor a csepp szétrobban Rayleigh-határnak nevezik, amely a 10. egyenlettel adható meg:

$$q_R = 8\pi (\epsilon_o \cdot \gamma \cdot R^3)^{1/2} \quad (10)$$

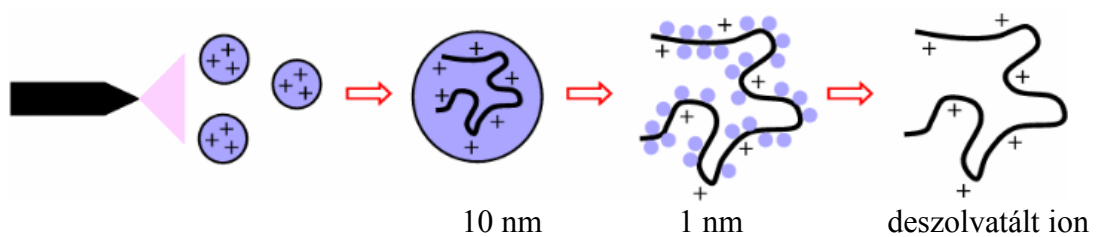
ahol, q_R : a kritikus töltés; ϵ_o : a vákuum permittivitása; γ : felületi feszültség; R: a csepp sugara.



6. ábra

Ionok képződése az ionelpárolgási modell alapján

A másik elmélet a töltés visszamaradási modell (Charge Residue Model, CRM), mely szerint főleg nagy molekulák esetén a cseppek szétrobbanásával, aprózódásával a felületről nem lépnek ki a nagyméretű ionok. A Coulomb robbanás addig folytatódik, amíg csak egy csepp marad, amely a vizsgált molekulát, adott számú oldószermolekulát és töltést tartalmaz¹¹². A töltött cseppek kisebb cseppekre esnek szét, miközben a cseppek felületéről oldószer párolog el. Egy adott méretű cseppnél már csak oldószer elpárolgása történik, és a csepp töltése visszamarad a vizsgálandó nagymolekulával együtt. A folyamatot a **7. ábra** mutatja.



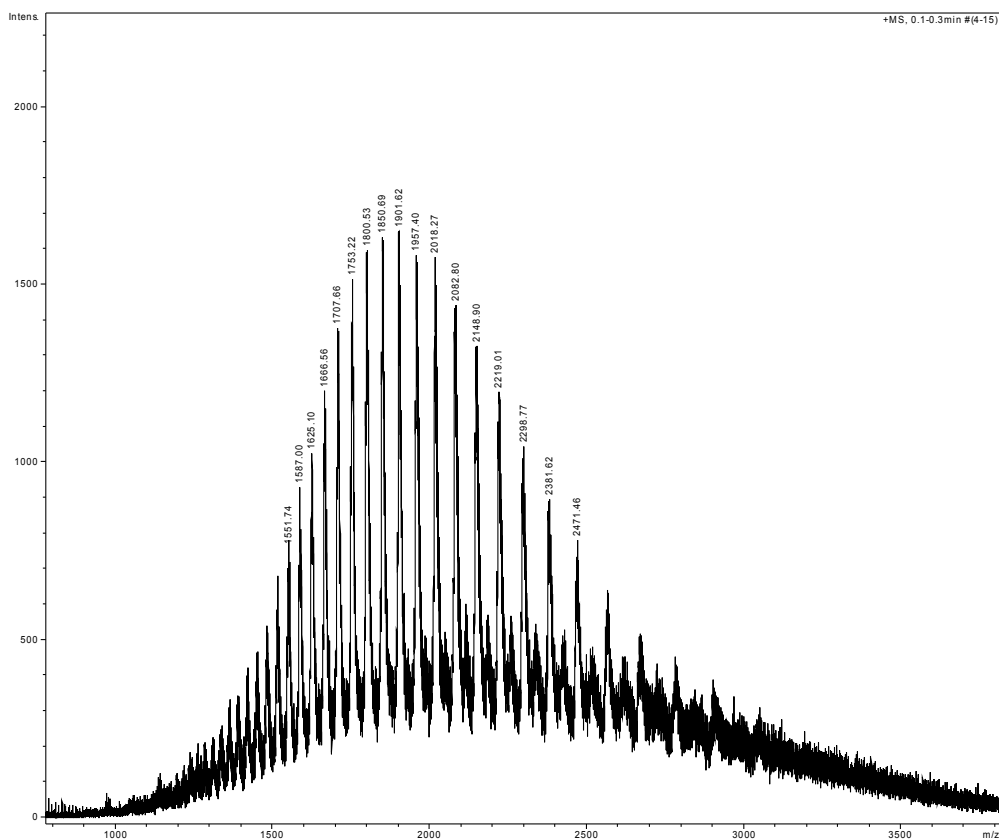
7. ábra

Az ionvisszamaradási modell mechanizmusa

A MALDI technikával ellentétben itt jellemző a többszörös töltések kialakulása, így ennél a technikánál a polimerek karakterizálása jóval nehezebb feladat, mint MALDI esetében. Például egy 2000 Da molekulatömegű polimer mérése során, az egyszeres töltésű sorozat mellett megjelenik a kétszeres, háromszoros töltésű sorozat is, illetve a molekulatömeg növelésével csak a többszörös töltésű sorozatok jelennek meg, amelyek

egymással átfedhetnek. Ezek a hatások meglehetősen bonyolulttá teszik a spektrum kiértékelését. Ugyanakkor ennél a módszernél nem jelentkezik a mátrixtartomány, mivel nincs szükség mátrixra. A mintát egyszerűen feloldjuk a megfelelő oldószerben, és ezt az oldatot juttatjuk az ionforrásba, így kis molekulák vizsgálatára az ESI jobban alkalmazható, mint a MALDI.

Az elektroporlasztásos technikánál a többszörös töltések kialakulása főleg proteinek és más nagyméretű makromolekulák vizsgálatánál nagy előnyt jelent. Korábban ezek ionizációját gyorsatombombázással (FAB) végezték, azonban nagy tömegeik kívül estek a detektálási tartományon. A mérésnek a felső detektálási molekulatömege $m/z = 8$ kDa volt. Az elektroporlasztásos technikánál azonban ezek a molekulák nagyszámú töltést vesznek fel, így például egy 50 kDa tömegű molekula $m/z = 1100$ körül jelenik meg¹¹³. A **8. ábra** a marhaszérum albumin (BSA) tömegspektrumát mutatja, amelynek a valódi molekulatömege 67,5 kDa.



8. ábra

A marhaszérum albumin ESI-TOF tömegspektruma

A töltések száma nemcsak önmagában a molekulatömegtől, hanem a vizsgált biomolekula alakjától is nagymértékben függ.

A technikának nagy előnye, hogy könnyen összekapcsolható kromatográfias módszerekkel, pl. HPLC, ilyenkor a minta on-line módon jut az összekapcsolt kromatográfias berendezés kolonnájáról, kapillárison keresztül, az MS ionforrásába.

II. 4.2. Karakterizálás ESI technika esetén és összehasonlítása a MALDI-val

Egyszeres töltés esetén ugyanúgy a (9)-es egyenlet érvényes, de ennél a módszernél már nem túl nagy – akár 800-1000 Da – molekulatömegnél is megjelennek a többszörös töltésű ionokhoz tartozó csúcsok is. Ha feltételezzük, hogy az addukt ionok egyféle kationokkal képződtek, akkor a következő összefüggés írható fel:

$$m/z = \frac{M + n \cdot C}{z} \quad (11)$$

ahol, M a molekula valódi tömege, z a töltés száma, n és C az ionizáló kation száma és tömege, m/z az az érték, amelynél az ion megjelenik a tömegspektrumban.

Ha, pl. egy nagy molekulatömegű fehérjemolekulát vizsgálunk, akkor míg MALDI esetében csak két, három csúcsot kapunk, vagyis megjelenik az egyszeres, kétszeres, esetleg háromszoros töltésű addukt ion, addig elektroporlasztásos technika esetén a kis tömegtartományban (700-1500 m/z) egy sorozat jelenik meg, melynek szomszédos csúcsai között a távolság nem egyforma. Ez abból származik, hogy ebben az esetben csak a fehérjemolekula nagyszámú töltéssel rendelkező addukt ionjai jelennek meg (pl. 20-szoros, 21-szeres, stb. töltésű ionok). Ha két szomszédos csúcsra (melyek között a töltéskülönbség 1) alkalmazzuk a (11). egyenletet, akkor a fehérjemolekula tömege, illetve az adott csúcshoz rendelhető töltés meghatározható feltételezve, hogy az ionizáció csak protonokkal történt.

Az elektroporlasztásos technika a MALDI-nál jóval érzékenyebb a minta tisztaságára. A MALDI esetében leginkább a mintában jelenlévő pufferek vagy egyéb sók zavarhatnak, mivel ezek tönkreteszhetik a mátrix kristályosodását, ezáltal drasztikusan leronthatják a jelintenzitást. Azonban, ha a reakcióban melléktermékek is keletkeztek, azokra leginkább az elektropray technika érzékeny, mivel sokszor előfordulhat, hogy nem tiszta minta esetén a termék egyáltalán nem jelenik meg a spektrumban, míg tisztítás után ugyanarról a mintáról jó spektrumot lehet készíteni.

Az ionizálás elősegítésére ennél a módszernél is alkalmazhatunk különböző alkáli fém sókat vagy savat, azonban a MALDI-nál elterjedten alkalmazott trifluoracetát sók már igen kis koncentrációban, negatív és pozitív mérési módban is klasztereket képeznek, és ezek sokszor zavarhatják a mérést.

Az elektroporlasztásos ionizáció elsősorban poláris, könnyen ionizálható, donoratomokat tartalmazó molekulák vizsgálatára alkalmas, míg a MALDI képes kevésbé poláris molekulák ionizációjára is.

Sokáig úgy vélték, hogy a két módszer vetélytársa egymásnak, de napjainkban az az általános vélemény, hogy a két technika nagyon jól kiegészíti egymást.

II. 4.3. Fragmentáció elektropray technika esetén

Ez a technika sokkal pontosabb MS/MS mérést tesz lehetővé, mint a MALDI-PSD, mert a tandem-MS mérésre képes készülék több analizátorral rendelkezik. Tanszékünkön jelenleg egy QTOF analizátorral felszerelt készülék van, melynek kvadrupól analizátorával kiválasztható (meglehetősen szűk $\pm 0,5$ Da pontossággal) a vizsgált tömeg, majd a kiválasztott molekula fragmentációját úgynevezett ütközésindukált disszociációval (Collision Induced Decomposition, CID) valósíthatjuk meg. Ez úgy megy végbe, hogy bizonyos addukt ionok fölös energiával rendelkeznek, amely energiátöbbletet ütközések során adják le, miközben egy vagy több unimolekuláris folyamatban elbomolhatnak. A feszültségek megfelelő megválasztásával növelhetjük a neutrális kismolekulákkal való ütközések számát, ezáltal növeljük a vizsgált részecskék fölös energiáját, amely elősegíti a fragmentációs folyamatokat.

Jelen disszertációban végzett kutatásokhoz kvázi MS/MS és MS/MS méréseket végeztem. A CID-fragmentációt úgy idéztem elő, hogy a bemeneti kapilláris és a szkimmer közötti feszültségkülönbséget változtattam („nozzle skimmer” CID).

II. 5. Az ESI és a MALDI MS egyéb alkalmazásai

Ipari szintéziseknél:

A MALDI technika kiválóan alkalmas az iparban előállított polimerek karakterizálására, tömegpontossága sokkal nagyobb, mint a korábban használt GPC készüléké. Természetesen döntő fontosságú ezen mintáknál a mintaelőkészítés (mátrix megválasztása, mintakoncentráció, ionizáló kiválasztása, stb.).

A kémiai iparban elsősorban szénhidrogének azonosítására, különböző adalékok (lágyítók, színezék anyagok) kimutatására használják, melyekre megfelelő mintaelőkészítés után az elektropray technika is jól alkalmazható¹¹⁴. Főleg olyan anyagok esetén kiemelkedő a fontossága, amelyek izobár szerkezetek, hiszen sokkal nagyobb tömegpontossága révén ezek

a szerkezetek akkor is megkülönböztethetőek, ha a vizsgált molekula nem, vagy rosszul fragmentálódik.

A finomkémiai ipar területén a MALDI elsősorban nagy molekulatömegű anyagok vizsgálatában nyújt segítséget, főként bevonatok (poliakrilátok, poliuretánok), speciális cellulózok (cellulóz-éterek) és tömítő anyagok (polisziloxánok) analízisében játszik fontos szerepet.

Élelmiszeripari területeken:

A MALDI MS módszert az élelmiszeripar is használja, azonban az elektropray technikával szemben részben háttérben szorul, mivel ez a technika könnyen kombinálható HPLC-vel, valamint az érzékenysége és a pontossága is jóval nagyobb. Ezzel együtt mindkét ionizációs technika széles körben használt, pl. élelmiszerek csomagolóanyagaiból kioldódott szennyezők analízisére, és természetes és szintetikus eredetű gyümölcslevek megkülönböztetésére¹¹⁵.

Gyógyszeripari területen:

A HPLC-ESI MS technikának nagyon nagy jelentősége van akár a gyógyszeriparban használt standard anyagok, hatóanyagok tisztaságának meghatározásában, akár ezen anyagok szerkezetének igazolásában, felderítésében.

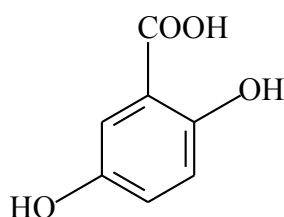
A MALDI MS technikát elsősorban biomakromolekulák, főként fehérjék gyors és rutinszerű azonosítására használják¹¹⁶⁻¹¹⁸.

III. Felhasznált anyagok, alkalmazott készülékek és a mintaelőkészítés

III. 1. Felhasznált anyagok

Mátrixok:

Munkám során a MALDI mérésekhez a 2,5-dihidroxi-benzoészav (DHB) mátrixot alkalmaztam, amelyet az Aldrich-tól (Németország) szereztem be. A mátrix szerkezeti képlete a **9. ábrán** látható:



9. ábra
2,5-dihidroxi-benzoészav
(DHB)

Ionizáló ágensként használt sók:

A MALDI mérésekhez ezüst-trifluoracetátot (AgTFA) (Aldrich, Németország) alkalmaztam.

Vizsgált anyagok:

- 2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin származékok (IV.2.1. fejezet 1. táblázat),
 - 2,3-dihidro-1,4- benzoxazepin származékok (IV.2.2. fejezet 3. táblázat),
 - 1,3,5 triszubsztituált 2-pirazolin származékok (IV.2.3. fejezet 6. táblázat),
- (Dr. Lévai Albert professzor úr bocsátotta a rendelkezésemre.)

Továbbá a klaszter-molekula kölcsönhatások tanulmányozásához a következő anyagokat használtam: diundecil-ftalát (BorsodChem Rt., Kazincbarcika, Magyarország), 7-(hexa-O-acetil- β -rutinoziloxi) izoflavon, 2-(1-acetil-5-fenilpirazol-3-il) fenil-diszulfid (Dr. Somogyi László professzor úr bocsátotta a rendelkezésemre).

Oldószerek:

Oldószerként tetrahidrofuránt (THF), metanolt (MeOH) és HPLC tisztaságú vizet használtam. A THF-et és a metanolt az Aldrich-tól (Németország) szereztem be.

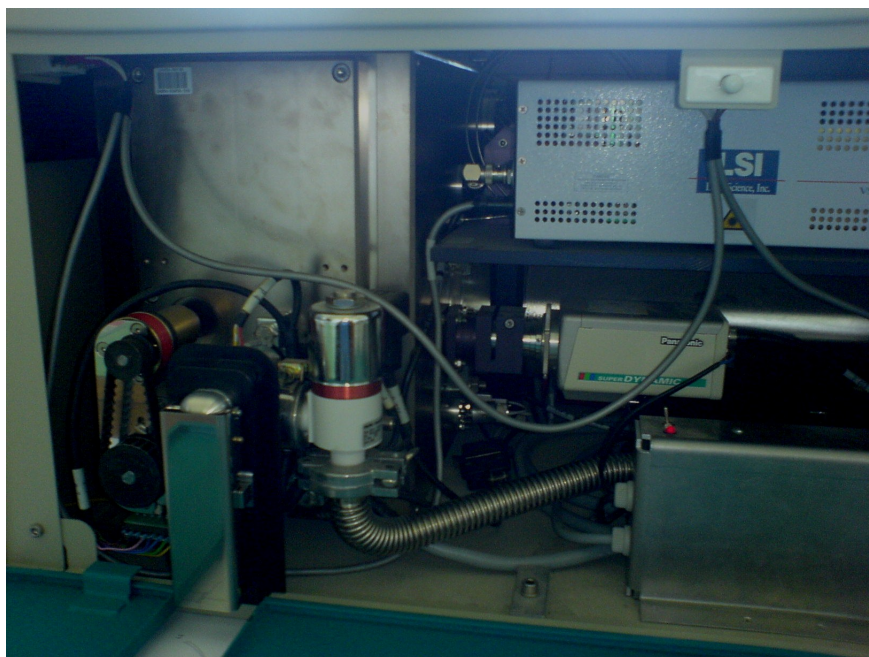
III. 2. Alkalmazott műszeres módszerek és szoftverek

MALDI-TOF tömegspektrométer:

A méréseket Bruker BIFLEX IIITM típusú repülési idő (TOF) analizátorral felszerelt tömegspektrométerrel végeztem. A lézer deszorpció kiváltására LSI típusú nitrogén UV-lézert alkalmaztam (337 nm, 10^6 - 10^7 W/cm²), a gyorsító feszültség 19 kV volt és a méréseket reflektoron módban végeztem. A lézerpulzusok frekvenciája 4 Hz volt.



10. ábra
MALDI-TOF tömegspektrométer



11. ábra
A MALDI ionforrása

PSD-MALDI-TOF MS/MS:

A fragmentáció vizsgálatára, illetve a szerkezetek meghatározására PSD-MALDI-TOF MS/MS módszert használtam. A PSD spektrumok felvételéhez a ± 10 Da-os ablakméretet a pulzerrel (ionszelektor) választottam ki, amely tartalmazta a vizsgálni kívánt prekursor iont. A kapott spektrumokat az XMASS 5.0 elnevezésű szoftver segítségével értékeltem ki. A PSD spektrumokat Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) segítségével kalibráltam.

ESI-TOF MS:

Az elektroporlasztásos méréseket Bruker gyártmányú BioTOF II és micrOTOF-Q tömegspektrométeren végeztem. A porlasztógáz és a szárítógáz nitrogén volt, a mintát infúziós pumpával (Cole-Parmer Ltd., Wernon Hills), 2 μ l/perc sebességgel juttattam az ionforrásba. Az adatrögzítés frekvenciája 2 GHz volt. A spektrumokat a DataAnalysis 3.4 szoftverrel értékeltem ki.



12. a ábra
BioTOF II ESI-TOF tömegspektrométer



12. b ábra

micrOTOF-Q ESI-TOF tömegspektrométer

III. 3. Mintaelőkészítés

Klaszter-molekula kölcsönhatás vizsgálata:

A 2-(1-acetil-5-fenilpirazol-3-il) fenil-diszulfidból 5 mg/ml-es koncentrációjú THF-es oldatot készítettem. A másik két mintát metanolban oldottam fel ugyanebben a koncentrációban. A THF-es minta esetében a mátrix ditranol volt (20 mg/ml THF-ben), a másik két esetben pedig DHB mátrixot alkalmaztam (20 mg/ml MeOH-ban). Az ionizáló az AgTFA volt, amelyet a mintának megfelelően vagy metanolban, vagy THF-ben oldottam fel. Ezután a következő keverési arányt alkalmaztam: mátrix/minta/ionizáló:5/1/1 (v/v arány). A keverékből 0,5-1 μ l-t cseppentettem fel.

2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin származékok vizsgálata:

A mintákat 5 mg/ml-es koncentrációban oldottam fel THF-ben, a mátrix ditranol volt (20 mg/ml THF-ben), ionizálóként AgTFA-t (5 mg/ml THF-ben) alkalmaztam. A protonnal képzett addukt ionok vizsgálatához a mátrixot kevertem a minta oldatával 5:1 v/v arányban, az ezüsttel képzett addukt ionok vizsgálatához a mátrix/minta/ionizáló:5/1/1 v/v arányt használtam. A mintatartó lemezre 0,5-1 µl-t cseppentettem fel a keverékből.

2,3-dihidro-1,4-benzoxazepin származékok vizsgálata:

A MALDI-val végzett vizsgálatoknál a mátrix DHB volt 20 mg/ml THF-ben, a minta koncentrációja 2 mg/ml volt szintén THF-ben, a mátrixot és az analitot 10:1 v/v arányban elegyítettem, és a keverékből 0,5-1 µl-t cseppentettem fel. ESI mérések esetén a mintát metanolban oldottam 50 µM koncentrációban.

1,3,5 trisubsztituált 2-pirazolin származékok vizsgálata:

A mintákat 10 µM-os koncentrációban oldottam fel 0,1 %-os trifluor-ecetsavat tartalmazó metanolban.

Fe(II)-fenantrolin komplexek vizsgálata:

Különböző FeL_3^{2+} komplexek gázfázisú stabilitásának vizsgálatához (ahol L a ligandumot jelöli) öt különböző ligandumú komplexet használtam: 1,10-fenantrolin; 5-klór-1,10-fenantrolin; 5-metil-1,10-fenantrolin; 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolin; 4,7-difenil-1,10-fenantrolin. A fragmentációt a BioTOF készülékben lévő kapilláris és szkimmer közötti feszültségkülönbség változtatásával idéztem elő. A fragmentáció kinetikáját az Arrhenius és a Rice-Ramsperger-Kassel (RRK) modell segítségével írtam le. A két modell paramétereit a kísérleti pontokra való illesztésekből számoltam, amelyeket Turbo Pascal programmal végeztem¹¹⁹.

IV. Eredmények és értékelésük

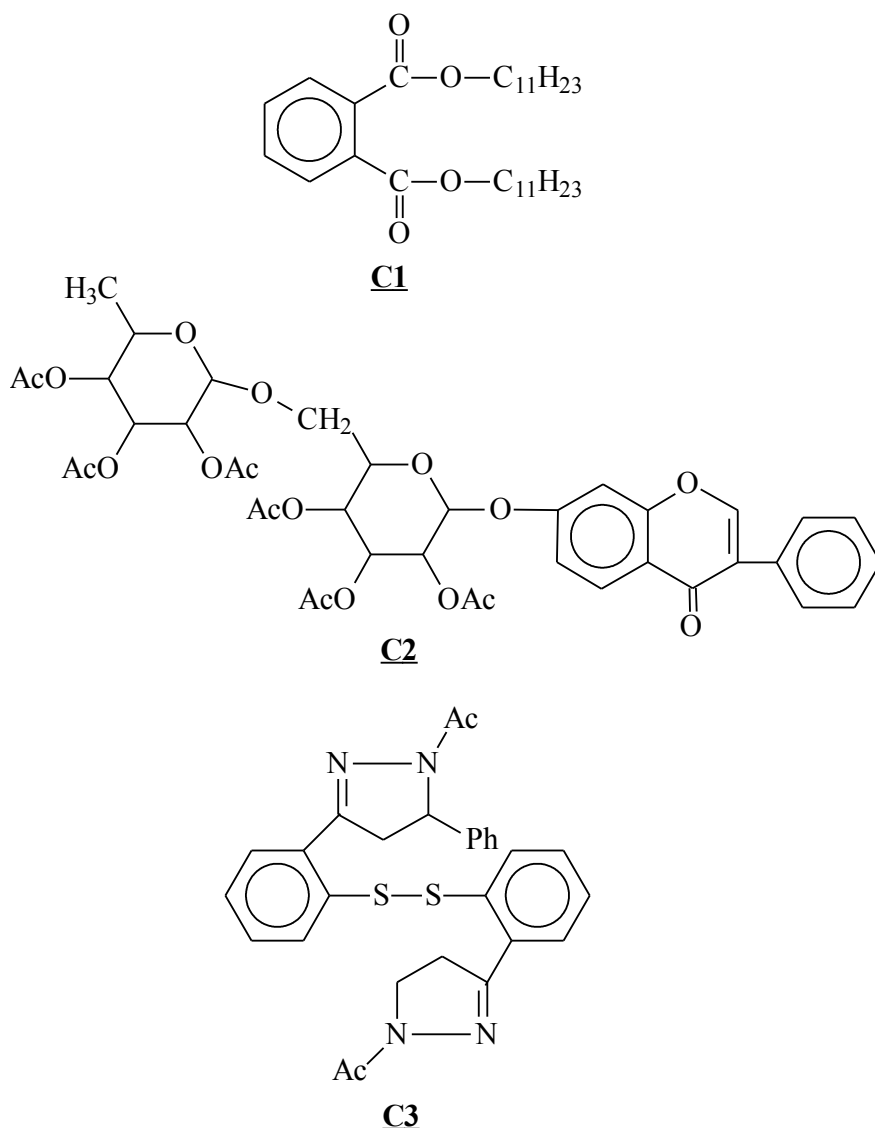
IV. 1. Klaszter-molekula kölcsönhatás vizsgálata

A MALDI-TOF tömegspektrometriában, mint ahogy azt már korábban említettem, nagyon fontos szerepe lehet a megfelelő ionizáló ágens kiválasztásának. Gyakran az anyag csak szoft ionokkal ionizálható, amelyhez leggyakrabban ezüst sókat használnak, ezek közül is leginkább az ezüst-trifluoracetát sót, mivel az jól oldódik szerves oldószerekben. Azonban az ezüst MALDI körülmények között könnyen nagyszámú klasztert képezhet.

Különböző kis molekulatömegű anyagok vizsgálata során észrevettem, hogy amennyiben ezüst a kationizáló, akkor az ezüsttel képződött addukt ion ($[M+Ag]^+$) és az esetleg képződött ezüst-klaszterek mellett megjelenik kis intenzitással a három atomszámú ezüst-klaszter ionnal képződött addukt ion is ($[M+Ag_3]^+$).

Ennek az ionnak a megjelenése néhány kérdést vetett fel bennünk, pl. milyen hatással van a klaszterion a molekula fragmentációjára, vagy éppen mi a különbség az ezüst-ionnal képzett addukt ion fragmentációjához képest?

Hogy kérdéseinket megválaszoljuk, három különböző kis molekulatömegű szerves molekulát vizsgáltam: egy lágyítót, egy peracetilezett izoflavon-glikozidot és egy pirazolilfenil-diszulfid származékot. Ezen anyagok képlete a **13. ábrán** látható. Azért esett ezen anyagokra a választás, mert fontos ipari anyagok, valamint természetes vegyületek prekursorai. Mindhárom vegyület tartalmaz aromás részt, amely elősegíti az ezüsttel történő ionizációt. Ugyanakkor a lágyítóban észter, az izoflavon származékban glikozidos, a pirazolilfenil-származékban pedig diszulfidkötés van. A továbbiakban a könnyebb kezelhetőség érdekében a vizsgált vegyületekre a **13. ábrán** látható jelöléseket használom.

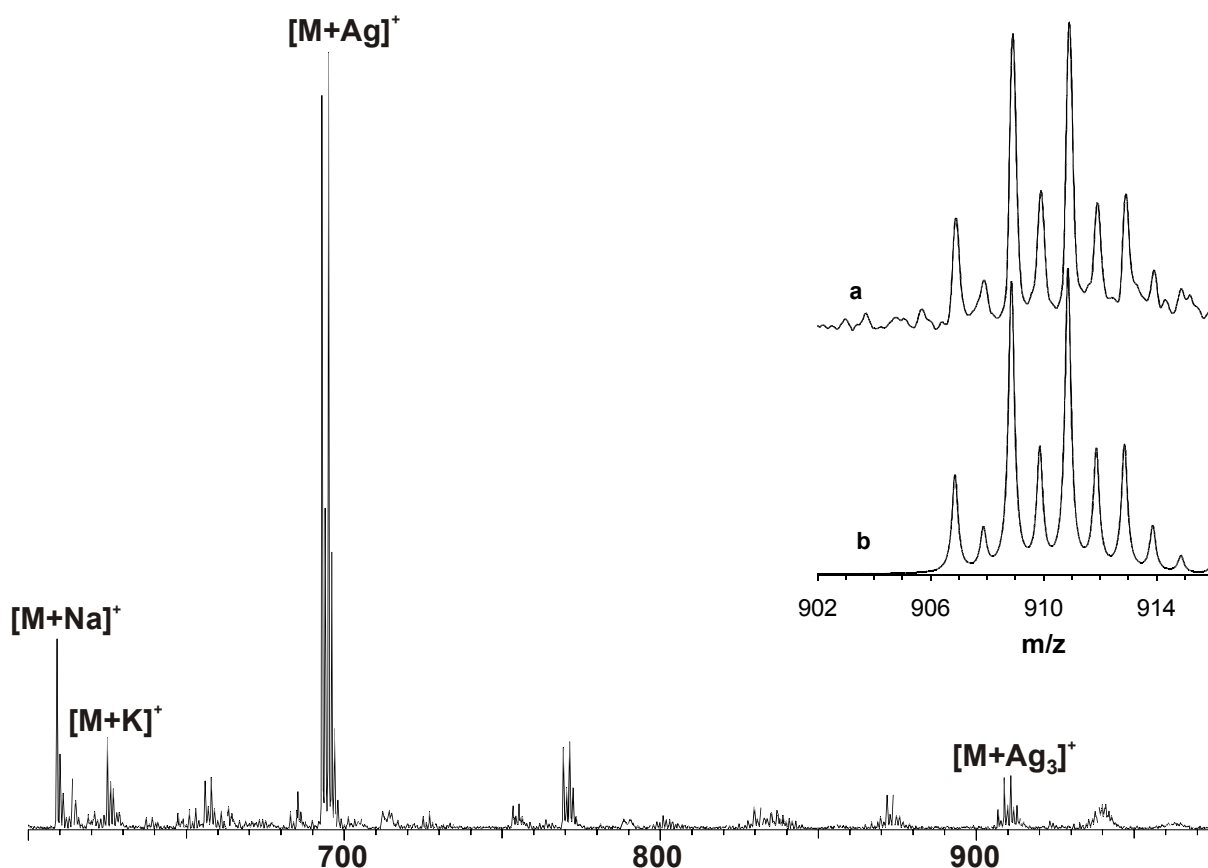


13. ábra

Vizsgált vegyületek: diundecil-ftalát (**C1**), 7-(hexa-O-acetil- β -rutinoziloxi)-izoflavon (**C2**), 2-(1-acetil-5-fenilpirazol-3-il) fenil-diszulfid (**C3**)

A kiválasztott származékok ideálisak voltak vizsgálataimhoz abból a szempontból is, hogy jól ionizálódnak ezüst ionnal, és könnyen képeznek addukt iont ezüst-klaszterrel, ráadásul ezek az ionok jól fragmentálódnak MALDI körülmények között. Korábban már vizsgálták fém-klaszterek és kis molekulák (pl. metanol) kölcsönhatását¹²⁰⁻¹²³, de klaszterrel képzett addukt ionok fragmentációját még nem írták le MALDI ionizáció esetén.

Méréseim során olyan spektrumokat kaptam, amelyben nagy intenzitással megjelent az ezüsttel ionizált molekula csúcsa, kisebb intenzitással az alkálifém ionokkal (Na^+ , K^+) és az ezüst-klaszterrel (Ag_3^+) képzett addukt ionhoz tartozó csúcs. A **C3**-as vegyület tömegspektruma a **14. ábrán** látható.



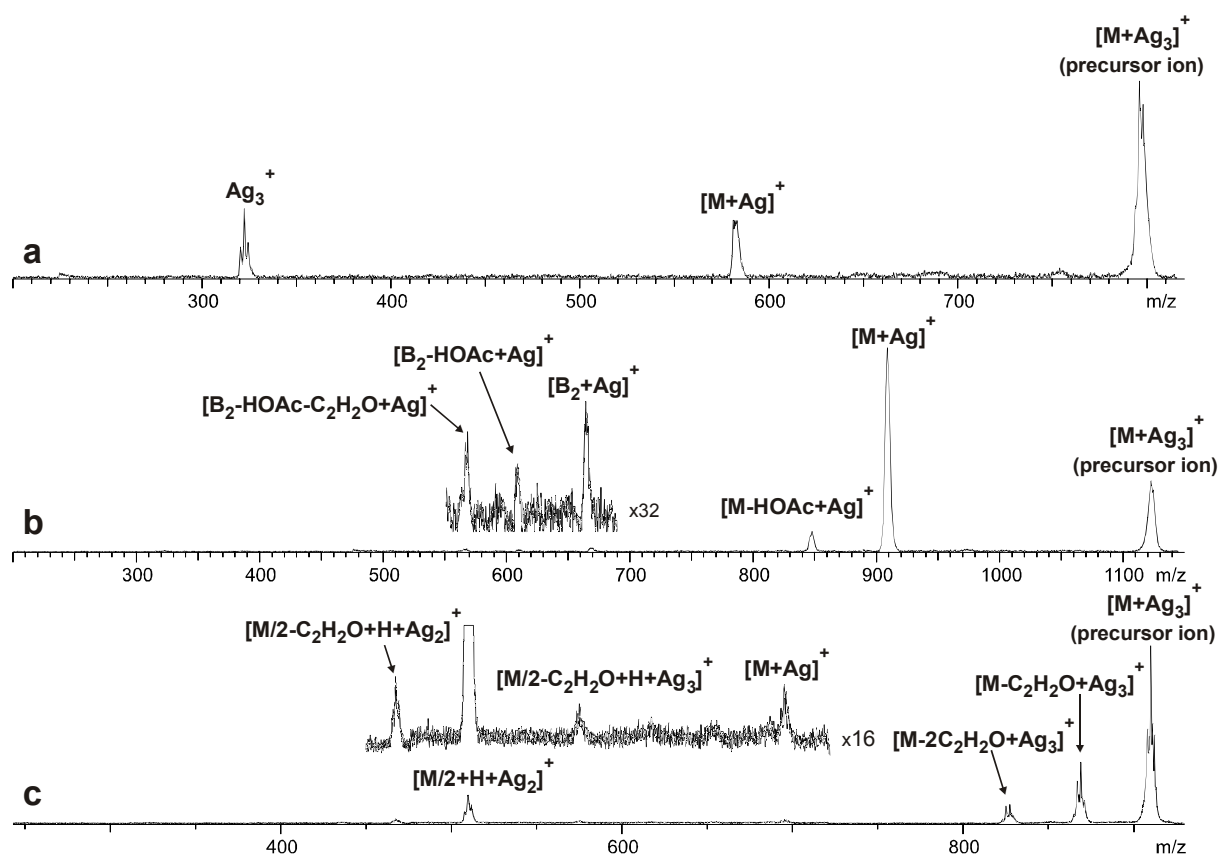
14. ábra

A **C3** vegyület MALDI-TOF tömegspektruma AgTFA ionizáló jelenlétében
A kis ábrán a $[C_3+Ag_3]^+$ mért (a) és számított (b) izotópeloszlása látható

A tömegspektrumban bejelöltem az említett addukt ionokat, a betét ábrán pedig kinagyítottam a klaszterrel képzett addukt ion izotópeloszlását. Jól látható, hogy a mért izotópeloszlás összehasonlítva a számítottal nagyon jó egyezést mutat. A **C1** és a **C2** anyag esetén hasonló spektrumokat kaptam, egyik esetben sem tapasztaltam $[M+Ag_2]^+$, illetve háromnál nagyobb atomszámú (pl. 5) ezüst-klaszterrel képzett addukt ionok megjelenését. Ezt az észrevételt a következőképpen magyaráztam.

A klaszter képződéséhez mátrix szükséges, és a mátrix anyagi minősége is jelentősen befolyásolja a klaszterképződés mértékét. A képződött klaszterek stabilitása a „Jellium-modellel” értelmezhető, ami ebben az esetben azt jelenti, hogy az Ag_3^+ -klaszter a legstabilabb a kis atomszámú klaszterek között. Mivel az ezzel képzett addukt ion intenzitása is viszonylag kicsi, így nem meglepő, hogy más kevésbé stabil (Ag_2^+ , Ag_5^+) klaszterekkel képzett $[M+Ag_2]^+$, $[M+Ag_5]^+$ ionok nem jelennek meg a spektrumban.

A továbbiakban az $[M+Ag]^+$ és az $[M+Ag_3]^+$ fragmentációját vizsgáltam PSD-MALDI-TOF MS/MS módszerrel. A **C1** anyag esetében a $[C1+Ag_3]^+$ MS/MS spektrumában (amely nem szerepel a disszertációban) a 427,9; a 279,2 és a 254,9 m/z értékek jelentek meg. Az első egy alkén ($C_{11}H_{22}$) kihaladásával értelmezhető, a második az undecil-alkohol ezüst-ionnal képzett adduktja ($[C_{11}H_{23}OH+Ag]^+$), a harmadik pedig a ftálsavanhidrid ezüst-ionnal képzett addukt ionja. Megjelenik a $[C1+Ag]^+$ -ből maga az ezüst-ion is, amely két csúcsot szolgáltat, az $^{107}Ag^+$ és az $^{109}Ag^+$ izotópokhoz tartozó csúcsokat. A **15. ábrán** a $[C1+Ag_3]^+$ (a), $[C2+Ag_3]^+$ (b) és $[C3+Ag_3]^+$ (c) PSD-MALDI-TOF MS/MS spektruma látható.



15. ábra

A $[C1+Ag_3]^+$ (a), $[C2+Ag_3]^+$ (b) és $[C3+Ag_3]^+$ (c) PSD-MALDI-TOF MS/MS spektruma

A **C1** esetében a PSD spektrumban a $[C1+Ag]^+$ ($m/z = 582,2$) jelent meg, amely egy Ag_2 -egység kihaladásának eredménye, valamint látható az Ag_3^+ klaszter-ionhoz tartozó csúcs is. Ez utóbbi jelzi, hogy a klaszterben lévő ezüst-atomok közötti kölcsönhatás erősebb, mint a $[C1+Ag_3]^+$ addukt iont összetartó kötések.

A következő vizsgált anyag a **C2** vegyület volt, amelynek $[C2+Ag]^+$ MS/MS spektrumában egy és két ecetsavvesztés jelent meg ($[C2-HOAc+Ag]^+$, $m/z = 846,1$; $[C2-2HOAc+Ag]^+$, $m/z = 786,6$). Másfelől jelentős fragmentáció volt megfigyelhető az

izoflavon és a peracetilezett diszacharid között lévő glikozidos kötésben. Ez a $[B_2+Ag]^+$ és az $[Y_0+Ag]^+$ ($m/z = 668,9$, illetve $345,9$) ionok megjelenését eredményezte, a jelölések Domon és Costello nevéhez fűződnek¹²⁴. A további fragmensek ebből a két fragmensből levezethetőek, pl. $[B_2-xHOAc-yC_2H_2O+Ag]^+$, ahol x és y a kihaladó ecetsav, illetve ketén-egységek számát jelölik. Megjelennek továbbá olyan fragmens ionok, amelyek nem tartalmazzák ezüstöt, pl. B_1^+ és Y_0^+ ($m/z = 273,0$ és $239,5$). A **C2** minta ezüst-klaszterrel képzett addukt ionjának PSD spektruma a **15.b. ábrán** látható. A spektrumban nem jelenik meg oly mértékű fragmentáció, mint a $[C2+Ag]^+$ esetében. Megfigyelhető Ag_2 -egység kihalása ($[C2+Ag]^+$, $m/z = 907,5$), de nem jelenik meg az Ag_3^+ klaszter-ion, ami arra utal, hogy ebben az esetben a molekula és a klaszter között lévő kölcsönhatás nagyobb, mint a klaszterben lévő ezüst-atomok közötti. Megtalálhatóak a spektrumban a $[C2-HOAc+Ag]^+$ ($m/z = 846,5$), továbbá a $[B_2+Ag]^+$ ($m/z = 668,5$), valamint ebből ecetsav, illetve ecetsav- és ketén-vesztéssel a $[B_2-HOAc+Ag]^+$ ($m/z = 608,9$) és a $[B_2-HOAc-C_2H_2O+Ag]^+$ ($m/z = 566,6$) ionok.

A harmadik vegyület egy pirazolilfenil-diszulfid származék (**C3**) volt. A szerves diszulfidok könnyen fragmentálódnak PSD körülmények között a diszulfid-kötés miatt. A $[C3+Ag]^+$ PSD spektrumában megfigyelhető ketén-vesztés ($[C3-C_2H_2O+Ag]^+$, $m/z = 653,1$). A diszulfid-kötés hasadásával a molekula kettéhasad, és megjelenik a $[C3/2+H+Ag]^+$, majd ebből ketén-vesztéssel a $[C3/2-C_2H_2O+H+Ag]^+$ ($m/z = 401,2$ és $358,9$). A kén-kén kötés hasadásakor hidrogén transzfer folyamat következtében egy hidrogén a molekula egyik feléről a másikra kerül, így azon SH-csoport lesz, a szögletes zárójelekben a H ezt a hidrogént jelöli. Megjelennek továbbá olyan ionok is, amelyek nem tartalmazzák ezüstöt, ilyen a $[C3/2]^+$ és a $[C3/2-C_2H_2O]^+$ ($m/z = 292,9$ és $251,4$).

A $[C3+Ag_3]^+$ PSD spektrumában (**15.c. ábra**) szintén megfigyelhető ketén-egységek vesztése: $[C3-C_2H_2O+Ag_3]^+$ és $[C3-2C_2H_2O+Ag_3]^+$ ($m/z = 869,1$ és $827,2$). Ez azt jelzi, hogy ebben az esetben az ezüst-klaszterben lévő kötések erősebbek, mint az acetil-kötés, hiszen az előző esetben ecetsav lehasadását csak Ag_2 -egység vesztés után tapasztaltam. Ennek a kihalása ebben az esetben is megtörténik eredményezve a $[C3+Ag]^+$ iont ($m/z = 695,3$), továbbá képződik a $[C3/2-C_2H_2O+H+Ag_3]^+$ ($m/z = 575,1$) ion is. Fontos észrevétel, hogy megjelenik a spektrumban a $[C3/2+H+Ag_2]^+$ és a $[C3/2-C_2H_2O+H+Ag_2]^+$ is ($m/z = 509,9$ és $467,5$), amely azt sugallja, hogy az Ag_2^+ klaszter-ion ezekhez a fragmensekhez kapcsolódva viszonylag stabil. Továbbá ebben az esetben nem tapasztaltam olyan ionok megjelenését, amelyek nem tartalmazzák ezüstöt, valamint az Ag_3^+ -klaszter sem jelent meg.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a **C1** és **C2** vegyület esetében az $[M+Ag_3]^+$ hasonlóan fragmentálódik, mintha az Ag_3^+ klasztert önmagában fragmentálnánk, vagyis nem tapasztaltam ezüstatom-vesztést, illetve jellemző az Ag_2 -egység kihasadása. Tehát az eredmények követik a „Jellium-modellt”, vagyis azok a klaszterek stabilabbak, amelyek páros számú elektront tartalmaznak.

A **C3** vegyület esetében a látszólagos ellentmondás úgy oldható fel, hogy a töltés főleg az aromás rendszeren delokalizálódik, így a hozzá kapcsolódó Ag_2 -klaszter közelítőleg semleges (vagyis páros számú elektront tartalmaz). Másrészt mind a kén, mind az ezüst soft-soft karakterű, így az ezüstion vagy az ezüst-klaszterek erős kölcsönhatásba lépnek a kénnel.

Az eredmények jelzik, hogy egy megfelelő molekulával való kölcsönhatásban az ezüst-klaszterek elektronszerkezete, ezáltal tulajdonságai nagymértékben változhatnak. A klaszterképződést a só mennyisége és a mátrix anyagi minősége mellett a vizsgálandó anyag is jelentősen befolyásolhatja. Az utóbbi állítás a három vizsgált vegyület közül különösen a harmadikra igaz, amely diszulfidkötést tartalmazott. Ugyanakkor valószínűleg minden molekula, amely a **C3**-as vegyülethez hasonló szoft karakterű atomokat tartalmaz, jelentős kölcsönhatásba léphet az ezüsttel.

IV. 2. Kis molekulatömegű vegyületek fragmentációjának vizsgálata PSD MALDI-TOF MS/MS és ESI-CID körülmények között

IV. 2.1. Benzotiazepin-származékok vizsgálata

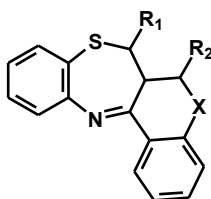
A MALDI technika, mint arról már korábban szó volt kiválóan alkalmas nagy molekulatömegű, nem illékony anyagok vizsgálatára, a módszert ennek érdekében fejlesztették ki. Azonban megfelelő mintaelőkészítés mellett a módszer jól alkalmazható kis molekulatömegű anyagok szerkezetének felderítésére, fragmentációjának vizsgálatára. Az m/z 500 alatti, úgynevezett mátrixtartományban nagyon sok csúcs jelentkezik, amely zavarhatja a mérést. Ezek a csúcsok származhatnak a mátrixból, lehetnek fragmensek vagy klaszterek. Ezen túl a mintának jól kell ionizálnia, hogy megfelelően nagy intenzitású jelet szolgáltatson, ehhez fontos a megfelelő ionizáló kiválasztása. További nehézséget jelenthet, hogy PSD esetén nem egy tömeget, hanem egy szűk tömegtartományt választunk ki ($\pm 5-10$ Da). Mivel a mátrixtartományban sok csúcs jelentkezik, előfordulhat, hogy ennek a tartománynak a kiválasztása nehéz, mert a vizsgált anyagok mellett más anyagok is megjelenhetnek a kiválasztott tömegtartományban. Ez azonban elkerülendő, mert nehezíti a PSD spektrum kiértékelését, illetve hibás következtetésekhez vezethet.

Ebben a részben benzotiazepin-származékok fragmentációjával foglalkozom, amely vegyületek sokféle biológiai aktivitásuknak köszönhetően a heterociklusos kémia és gyógyszerkémia figyelmének középpontjában helyezkednek el. Vizsgálták már számos benzotiazepin-származék tömegspektrometriás viselkedését EI és FAB módszerrel¹²⁵⁻¹²⁹. Ezek a vegyületek előállíthatók 2-amino-tiofenol és exociklusos α,β -telítetlen ketonok reakciójából¹³⁰⁻¹³².

Munkám során 2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin-származékokat vizsgáltam PSD MALDI-TOF MS/MS módszerrel. A kiválasztott tömegablak 20 volt, amely magába foglalta a vizsgált prekursor iont. Az ionizálás protonnal, valamint ezüst ionokkal történt. A vizsgált 2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin származékok az **1. táblázatban** láthatóak:

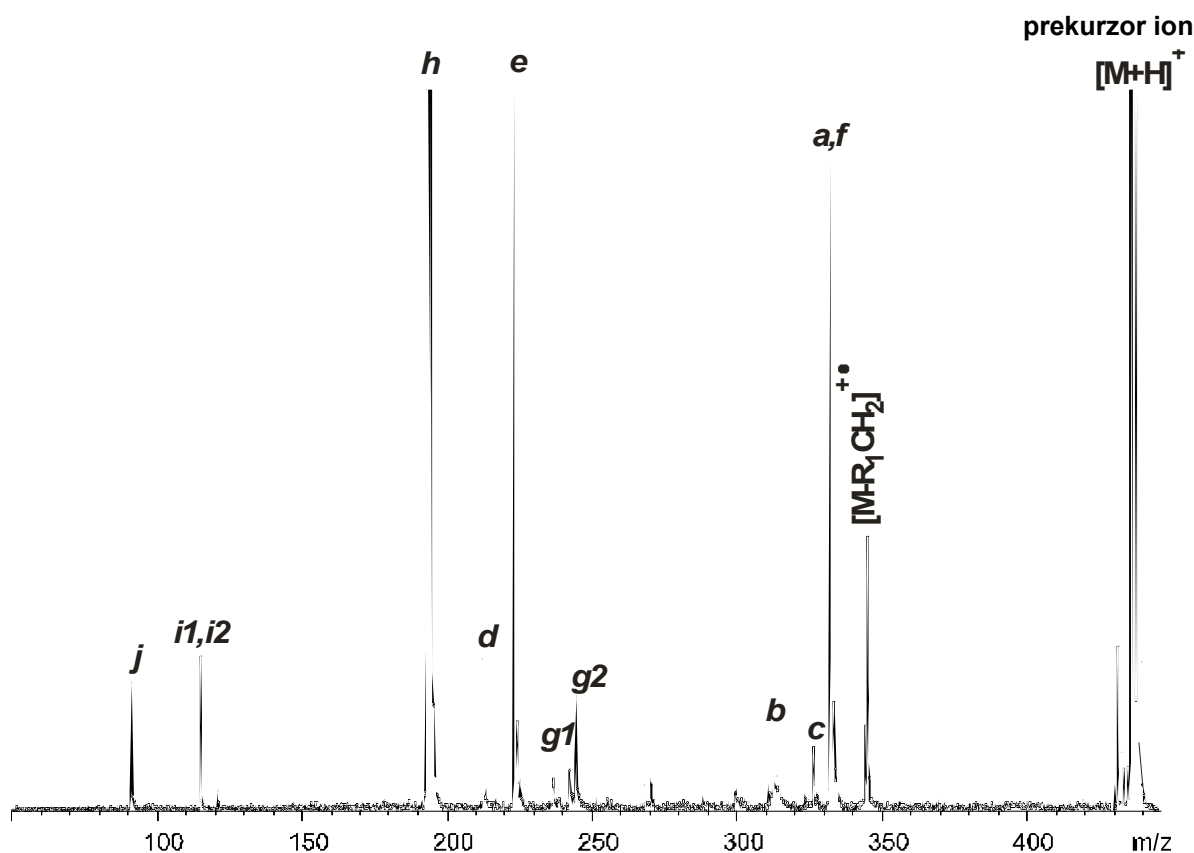
1. táblázat

A vizsgált 2,3-dihidro-1,5-benzotiazepin származékok



	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
R ₁						
R ₂	-H				-H	
X	S	S	S	S	O	O

A táblázatból jól látható, hogy a vizsgált vegyületek -R₁, -R₂ csoportokban és X atomban különböztek egymástól. Először a protonnal képzett addukt ionok PSD spektrumait mértem le. Mindegyik anyag jól ionizálódott protonnal, így intenzív jelet adott, valamint a **16. ábrán** látható, hogy a PSD spektrumban nagyszámú fragmens ion jelent meg. Az ábrán a 2-es minta PSD spektruma látható:



16. ábra

A 2-es minta ($[M+H]^+$) PSD MALDI-TOF MS/MS spektruma

Az ábrán az egyes csúcsokhoz tartozó jelölések az azonosított szerkezeteket jelölik, amelyek a **17. ábrán** látható bomlási sémán vannak feltüntetve. Látható, hogy gyakorlatilag minden fragmens csúcsot sikerült azonosítani.

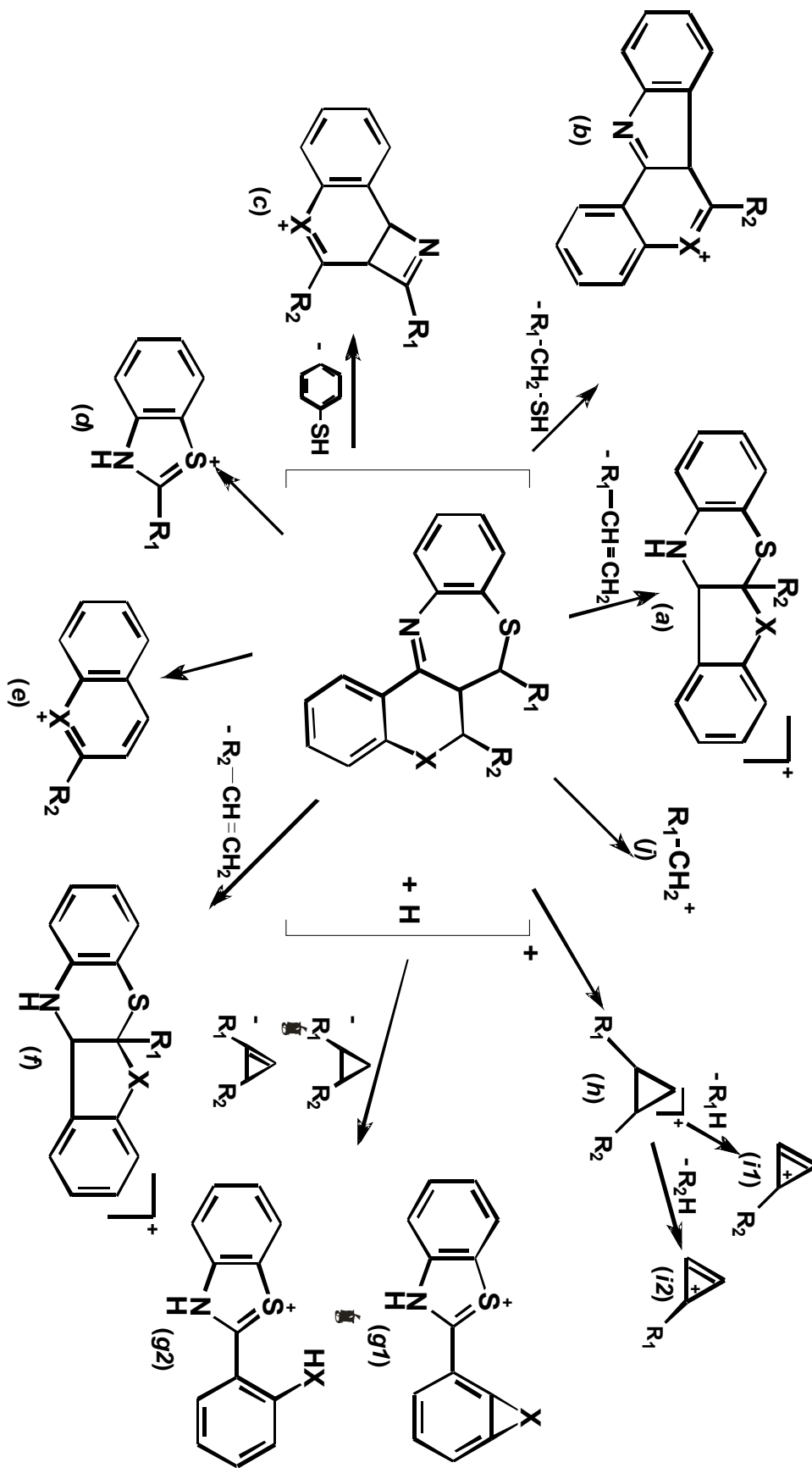
A kiválasztott $[M+H]^+$ addukt ionok könnyen veszítenek $R_1CH=CH_2$ és $R_2CH=CH_2$ egységeket, amelynek eredményeképpen **a** és **f** fragmens ionok keletkeznek. Méréseim során azt tapasztaltam, hogy az **f** fragmenshez tartozó csúcs intenzitása jóval kisebb, mint az **a** fragmenshez tartozó csúcsé, ami azt mutatja, hogy a tiazepin gyűrűből kedvezményezettebb ez a fragmentáció még akkor is, ha az X kén (a 3-as és 4-es vegyület esetében is **a** intenzitása jóval nagyobb). Abban az esetben, ha R_2 hidrogén (1-es és 5-ös vegyületek) nem tapasztaltam etilén kihasadását a molekulából.

Megfigyelhető továbbá R_1-CH_2-SH és tiofenol molekula kihasadása, amely a **b** és a **c** fragmenseket eredményezi. A tiofenol molekula kihasadása az első négy vegyületnél, ahol X kén, kétféle módon is történhet: a tiazepin gyűrű hasadásával, illetve a tiokromén gyűrű hasadásával. Azonban abban az esetben, ha X oxigén volt (5-ös, 6-os vegyületek) nem tapasztaltam fenol kihasadását, így valószínűleg a tiofenol kilépése a másik négy molekula esetében is a tiazepin gyűrű hasadásának következménye. Ennek a hasadásnak következtében képződik az R_1 -szubsztituált benzohidrotiazol ion (**d**) és/vagy - attól függően, hogy a töltés hol helyezkedik el - az **e** fragmens ion.

A protonált addukt ionból megfigyeltem 1,2-diszubsztituált-ciklopropán és -ciklopropén származékok kihasadását, amelyek 2-szubsztituált-benzohidrotiazol ionokat (**g1**, **g2**) eredményeztek. A töltés lokalizációjától függően a hasadás ciklopropil kationt is szolgáltatott (**h**), ami valamennyi vegyület esetében intenzív csúcsként jelentkezett a spektrumban. A **h** kation fragmentációjának eredményeképpen két további ion megjelenését tapasztaltam, ezek feltehetően a ciklopropán kationból képződtek R_1H (**i1**), illetve R_2H (**i2**) kihasadásával. Fontos megjegyezni, hogy közvetlenül a kiindulási molekulából egyik minta esetében sem tapasztaltam R_1H és/vagy R_2H veszítést.

Megjelent a spektrumban az $R_1-CH_2^+$ fragmens ion (**j**), amelyet a 4-es összetételű vegyület kivételével minden spektrumban sikerült kimutatni. Ennek az lehet az oka, hogy a 4-es minta kivételével minden esetben az R_1 szubsztituens homoaromás, így a képződött benzil kation, vagy a 3-as minta esetében, benzil jellegű kation (ahol R_1 nem fenil, hanem β -naftil csoport) stabilabb, mint a heteroaromás csoport esetén képződő $R_1-CH_2^+$.

A különböző származékok esetében képződött fragmens ionok mért és számított (zárójelben) m/z értékeit a **2. táblázatban** foglaltam össze.



17. ábra
2,3-dihidro-1,5-benzotiazepinek bomlási sémája

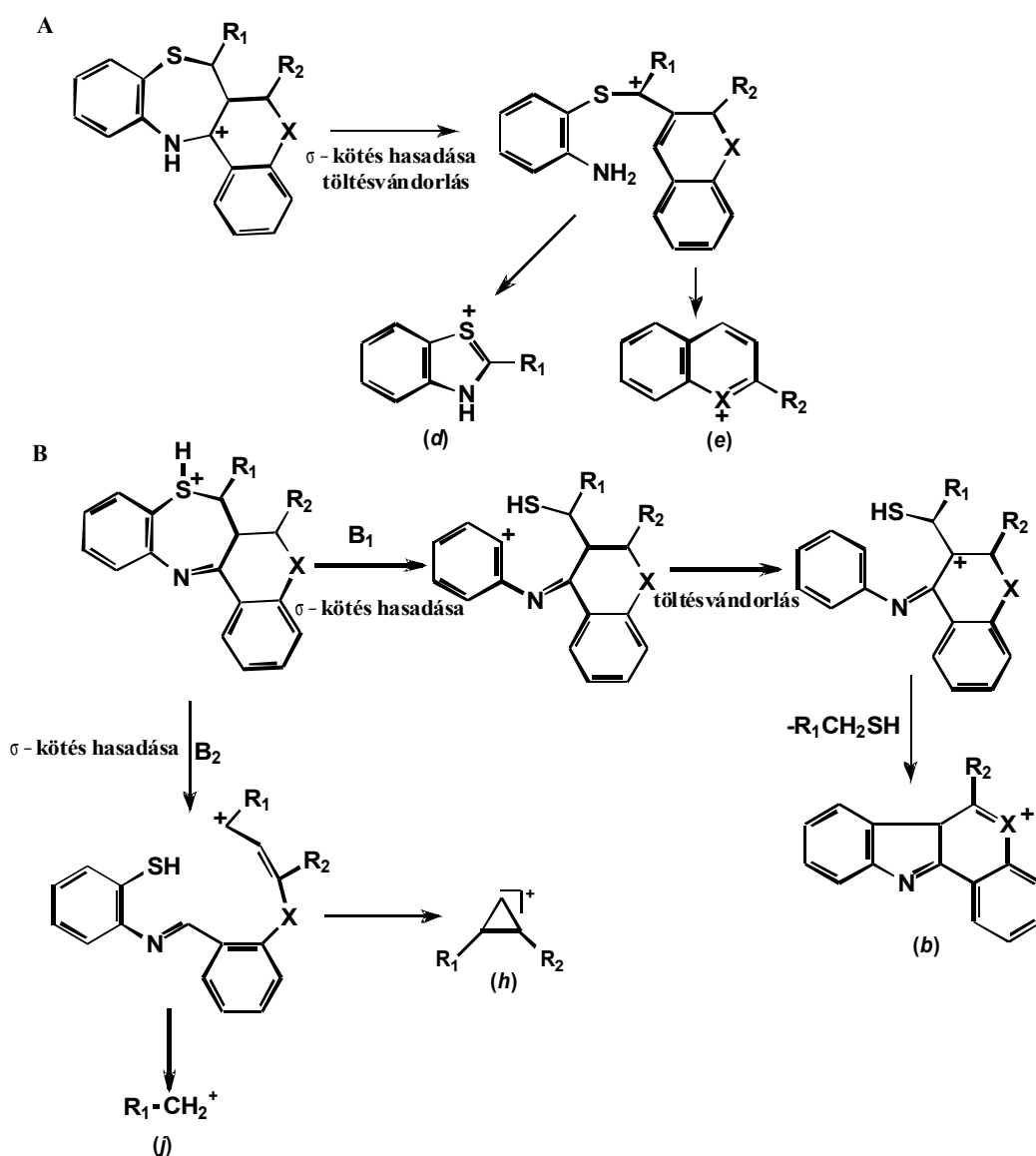
2. táblázat

A képződött fragmens ionok mért és számított (zárójelben) m/z értékei
A * más csúccsal való átfedést jelöl.

Vegyület						
Fragmens ion	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
<i>a</i>	256,4 (256,4)	332,3 (332,5)	332,6 (332,5)	332,2 (332,5)	240,4 (240,3)	316,3 (316,4)
<i>b</i>	236,6 (236,3)	312,4 (312,4)	312,8 (312,4)	312,7 (312,4)	-	296,4 (296,4)
<i>c</i>	250,6 (250,3)	326,4 (326,4)	-	332,3 (332,5)	234,5 (234,3)	310,4 (310,4)
<i>d</i>	212,2 (212,3)	212,1 (212,3)	262,6 (262,4)	-	212,1 (212,3)	212,2 (212,3)
<i>e</i>	147,0 (147,2)	223,3 (223,3)	223,2 (223,3)	223,1 (223,3)	131,1 (131,2)	207,2 (207,3)
<i>f</i>	-	332,3 (332,5)	382,2 (382,5)	338,2 (338,5)	-	316,3 (316,4)
<i>g1</i>	242,3 (242,3)	242,2 (242,3)	*	242,3 (242,3)	-	-
<i>g2</i>	244,4 (244,4)	244,4 (244,4)	*	244,3 (244,4)	228,5 (228,3)	-
<i>h</i>	117,1 (117,2)	193,2 (193,3)	243,4 (243,3)	199,1 (199,3)	117,1 (117,2)	193,3 (193,3)
<i>i1</i>	-	115,2 (115,2)	-	-	-	115,1 (115,2)
<i>i2</i>	-	115,2 (115,2)	-	-	-	115,1 (115,2)
<i>j</i>	91,3 (91,1)	91,2 (91,1)	141,5 (141,2)	-	91,1 (91,1)	91,1 (91,1)

Az eddig tárgyalt ionok lezárt elektrónhéjjal (EE) rendelkeznek, azonban megfigyelhető a spektrumban $R_1-CH_2^+$ gyök (OE) vesztese is, amelyet a **19. ábrán** $[M-R_1CH_2]^+$ -vel jelöltem. Az $[M-R_1CH_2]^+$ nominális tömege megegyezik annak a fragmensionnak az összetételével, ami akkor keletkezne, ha $R_1=NH$, azirin típusú molekula lépne ki a prekursor ionból. Azonban ennek a molekulának a kilépése, figyelembe véve a kiindulási molekula szerkezetét nem valószínű. Így az $R_1-CH_2^+$ gyök kilépése a legvalószínűbb. Mivel a prekursor ion lezárt elektrón szerkezetű, így a kihaladáshoz szén-szén kötés hasadása szükséges, ami nagy energiát igényel. Hasonló jelenséget már leírtak MALDI körülmények között vizsgált zsírsavakra¹³³.

A fragmentáció javasolt mechanizmusa a **18. ábrán** látható:



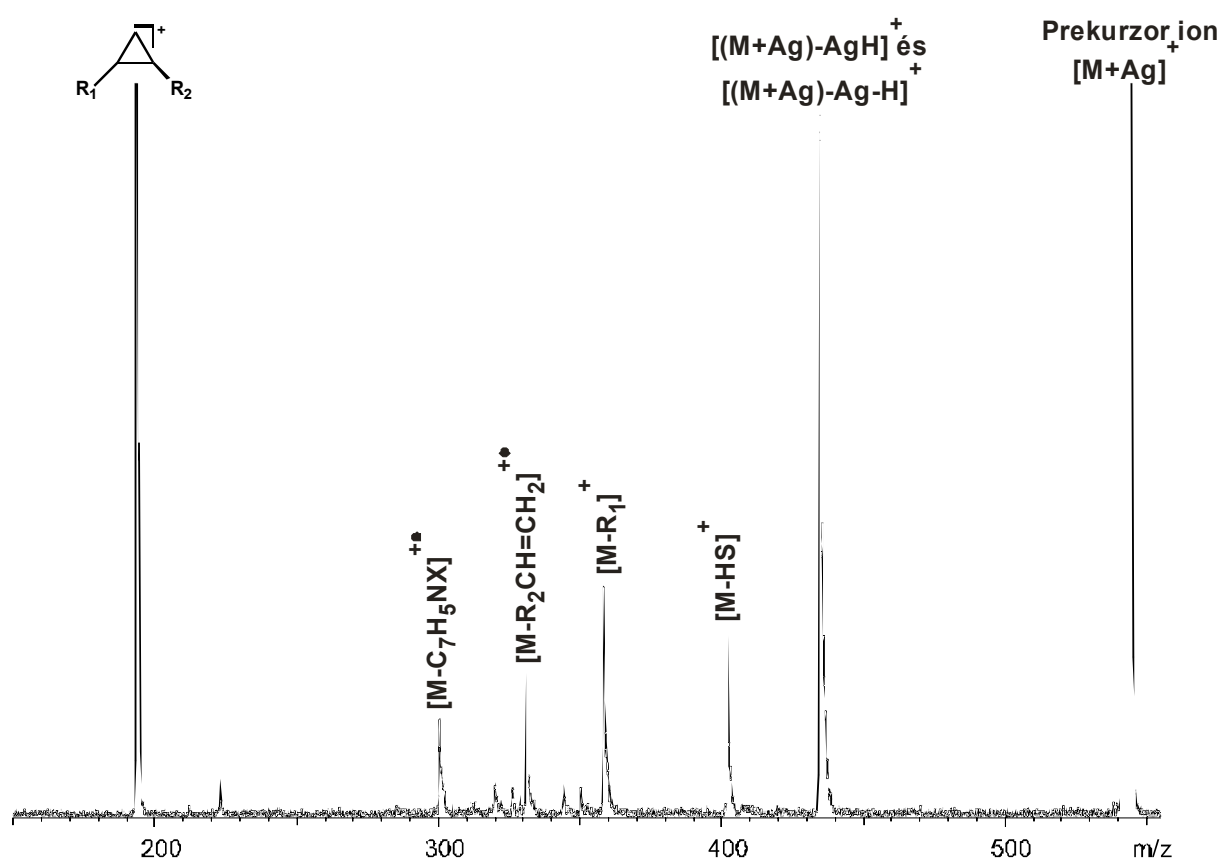
18. ábra
Fragmentációs utak $[M+H]^+$ esetén

A kísérleti eredmények alapján a **18. ábrán** feltüntetett fragmentációs útvonalak valószínűsíthetőek.

Az **A** fragmentációs útvonalon a proton a nitrogénen található, a N-C(4) kötés hasadása után töltésvándorlással, az ábrán látható nyílt szerkezethez jutunk, majd ebből újabb kötéshasadással a **d** és az **e** fragmensek képődnek, attól függően, hogy a kötéshasadás után a töltés hol helyezkedik el. A **B** fragmentációs útvonal esetében a proton a tiazepin gyűrű kénatomján helyezkedik el. Első lépésben a kén és a benzolgyűrű szénatomja között történik meg a kötéshasadás (**B**₁), majd töltésvándorlás és R₁-CH₂-SH molekula kihasadásával a **b** kationhoz jutunk. A **B**₂ útvonalon az SC(2) és a C(3)-C(4) kötéshasadások után a **21. ábrán**

látható nyílt láncú kationhoz jutunk, majd ebből töltésvándorlással és további kötéshasadással kaphatjuk meg az egyes fragmens ionokat. Például, ha a töltés az C(5)-on helyezkedik el, akkor az $R_1-CH=CH_2$ molekula kihaladásához vezet, melynek eredményeképpen az **A** fragmens iont kapjuk. Hasonló gyűrűfelnyílás történhet a tiazepin gyűrű melletti kromén vagy tiokromén ($X = O$ vagy S) gyűrűn, melynek eredményeképpen $R_2-CH=CH_2$ molekula hasad ki és az **(f)** fragmens ion keletkezik.

Annak érdekében, hogy a kationok fragmentációra gyakorolt hatását tanulmányozhassam, megvizsgáltam a molekulák $[M+Ag]^+$ ionjának fragmentációját is. Az ionizáló ebben az esetben AgTFA volt. A **19. ábra** a 2. minta PSD spektrumát mutatja.



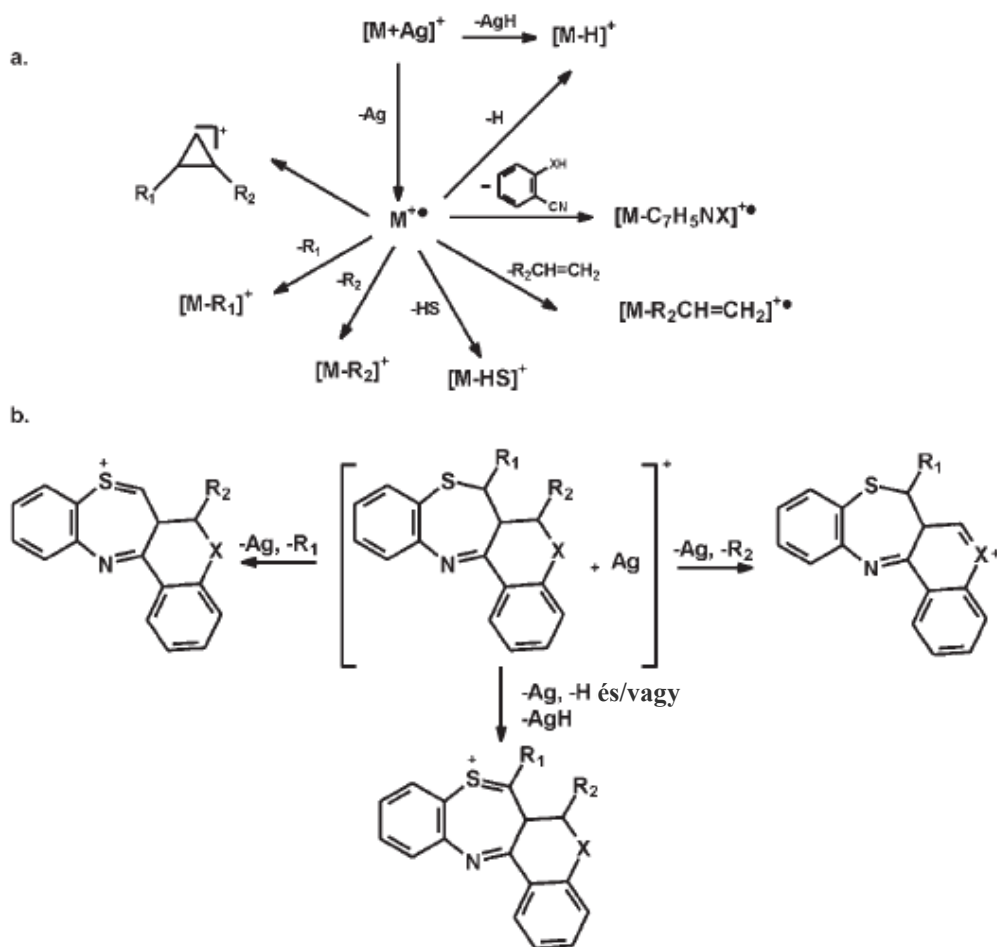
19. ábra

A 2. minta $[M+Ag]^+$ ionjának PSD spektruma

Az ábrán látható, hogy az $[M+Ag]^+$ esetében a PSD spektrum nagymértékben különbözik a $[M+H]^+$ PSD spektrumoktól, az egyes csúcsokhoz tartozó szerkezetek a csúcsok fölött vannak jelölve. Megfigyelhető, hogy ezek többsége a kationizálót nem tartalmazza, amelyet nemcsak tömeg alapján, hanem izotópeloszlás alapján is könnyű eldönteni, hiszen az ezüstre jellemző a 107-es és 109-es izotóp, amely a PSD spektrumban dupla csúcsként

jelentkezik. Az első fragmens ion, amely megjelenik a spektrumban, az AgH és/vagy Ag, majd H kihasadás következtében jön létre. Ezüsttel képzett addukt ionok vizsgálata közben, MALDI körülmények között, megfigyeltek már ezüstatom veszteséget peracetilezett izoflavon-glükozidoknál¹³⁴, továbbá Ag és H vagy AgH kihasadást is aminosavak ESI-CID vizsgálata során¹³⁵. Eredményeim alapján valószínűsíthető, hogy mindkettő lejátszódik, az ezüstatom kihasadásával egy gyök kation marad vissza, amely hidrogénatom veszteséssel stabilizálódhat, melynek következtében lezárt elektronhéjú fragmens ion keletkezik. Ez a stabilizáció nemcsak hidrogénatom veszteséssel, hanem R₁, R₂ és HS gyökök kihasadásával is végbemehet. Tapasztaltam azonban nem gyök típusú molekulák kilépését is (R₂-CH=CH₂, 2-cianofenol vagy

2-ciano-tiofenol), ennek következtében gyök kationok is megjelentek a spektrumban. A protonnal képzett addukt ionokkal ellentétben R₁-CH=CH₂ molekula kihasadását nem tapasztaltam, ugyanakkor a diszubsztituált ciklopropil kation ezüsttel való ionizáció esetén is minden esetben intenzíven megjelent a PSD spektrumban. A bomlási séma a **20. ábrán** látható.



20. ábra

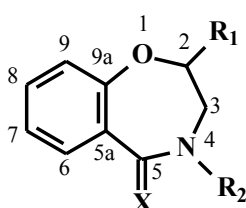
Javasolt fragmentációs útvonalak (a), $[M-H]^+$, $[M-R_1]^+$ és $[M-R_2]^+$ fragmens ionok képződésére (b)







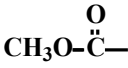
IV. 2.2. Benzoxazepin-származékok vizsgálata

Számos benzoxazepin-származéknak napjainkban nagy jelentősége van, mivel fontos biológiai és gyógyszeres hatással bírnak, mint pl. fájdalomcsillapító, görcsoldó és nyugtató szerek¹³⁶⁻¹⁴⁰. Ezeknek a fontos tulajdonságoknak köszönhetően nagyszámú benzoxazepin-származékot szintetizáltak¹⁴¹⁻¹⁴⁴, valamint ezek fragmentációját is vizsgálták elektronionizáció segítségével^{145,146}. A benzoxazepinek könnyen előállíthatók a flavonoid-származékok jól ismert Schmidt-reakciójával.

Munkám során, a benzotiazepin-származékok tanulmányozásának folytatásaként, hét benzoxazepin-származék fragmentációját vizsgáltam PSD-MALDI-TOF MS/MS és ESI-CID körülmények között. A vizsgált anyagokat a **3. táblázatban** tüntettem fel.

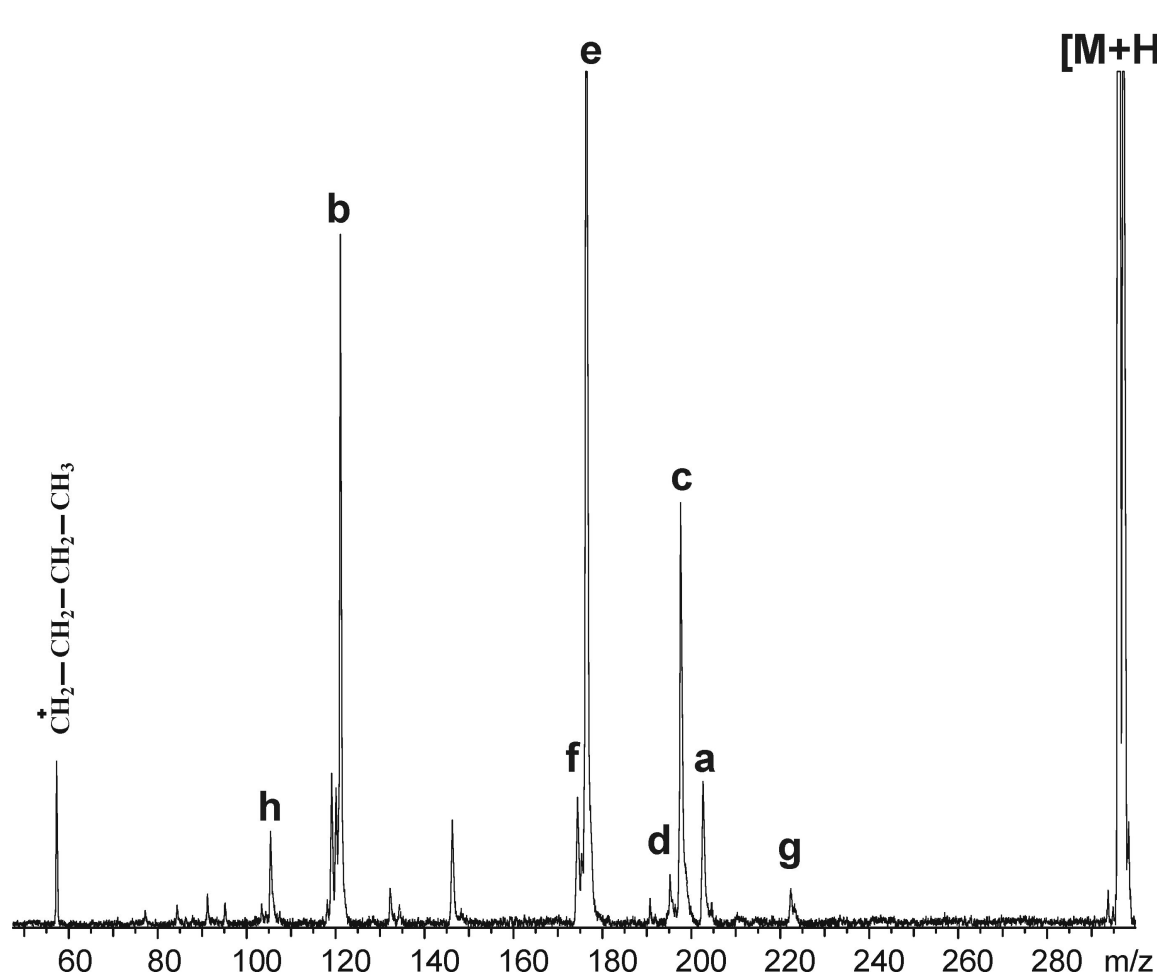
3. táblázat
2,3-dihidro-1,4- benzoxazepin származékok



	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
R₁	H-						
R₂	H-	H-	CH ₃ -	C ₄ H ₉ -		CH ₃ -	C ₄ H ₉ -
X	O	O	O	O	O	S	S

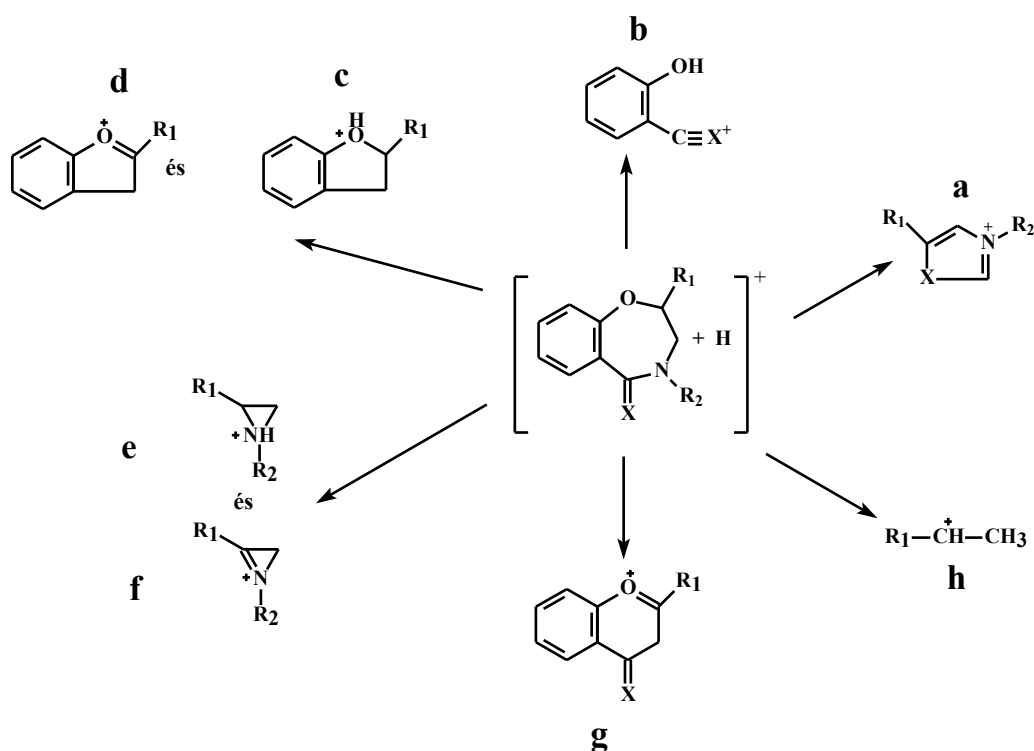
Az anyagok karakterizálása ¹H-NMR-rel, ¹³C-NMR-rel, IR-spektroszkópiával és elemanalízissel történt. Megfigyelhető, hogy a vizsgált származékok R₁, R₂ és X csoportokban különböznek egymástól. Az R₁ szinte minden esetben fenil-csoport, az X oxigén vagy kén, az R₂ pedig hidrogén, alkil-, illetve metoxi-karbonil-csoport. PSD spektrumok esetén a prekursor ion $\pm 5-10$ Da tömegablakkal volt kiválasztva. ESI-CID esetében a fragmentációt a kapilláris és a skimmer közötti feszültségkülönbség változtatásával idéztem elő. Mindkét módszer esetében a protonnal képzett addukt ionok fragmentációját vizsgáltam. A MALDI mérések során mindegyik vegyületnek intenzíven megjelent a spektrumban az $[M+H]^+$ addukt ionja, a

fragmentáció vizsgálatához - PSD esetén - ezeket a csúcsoakat választottam ki. A 4. minta PSD spektruma a **21. ábrán** látható.



21. ábra
A 4. minta PSD-MALDI-TOF MS/MS spektruma

A **21. ábrán** a 4. minta protonnal képzett addukt ionjának fragmentációja látható ($[M+H]^+$), a megjelenő fragmens ionokat különböző betűkkel jelöltem, az ezekhez tartozó szerkezetek a **22. ábrán** láthatóak, amely benzoxazepinek bomlási sémáját ábrázolja PSD körülmények között. Megjelenik továbbá a spektrumban az 1-butil-kation, amelyet nem jelöltem betűvel, hiszen ez csak a 4-es és a 7-es mintában jelenik meg, mert csak ezek tartalmazznak R_2 -csoportként butil-csoportot, a többi vegyület hidrogén-, metil- vagy metoxi-karbonil-csoportot tartalmaz, és ezeknél az R_2 -csoport ilyen jellegű lehasadását nem tapasztaltam.



22. ábra

A vizsgált benzoxazepin-származékok általános bomlási sémája PSD körülmények között

A számított (zárójelben) és a mért tömegeket a **4. táblázatban** tüntettem fel. Jól látható, hogy a számított és mért tömegek jó egyezésben vannak.

4. táblázat

A benzoxazepin-származékok fragmenseinek mért és számított tömegei
(A számok az egyes származékokat jelölik, a betűk pedig az adott származék esetében megjelenő fragmenseket)

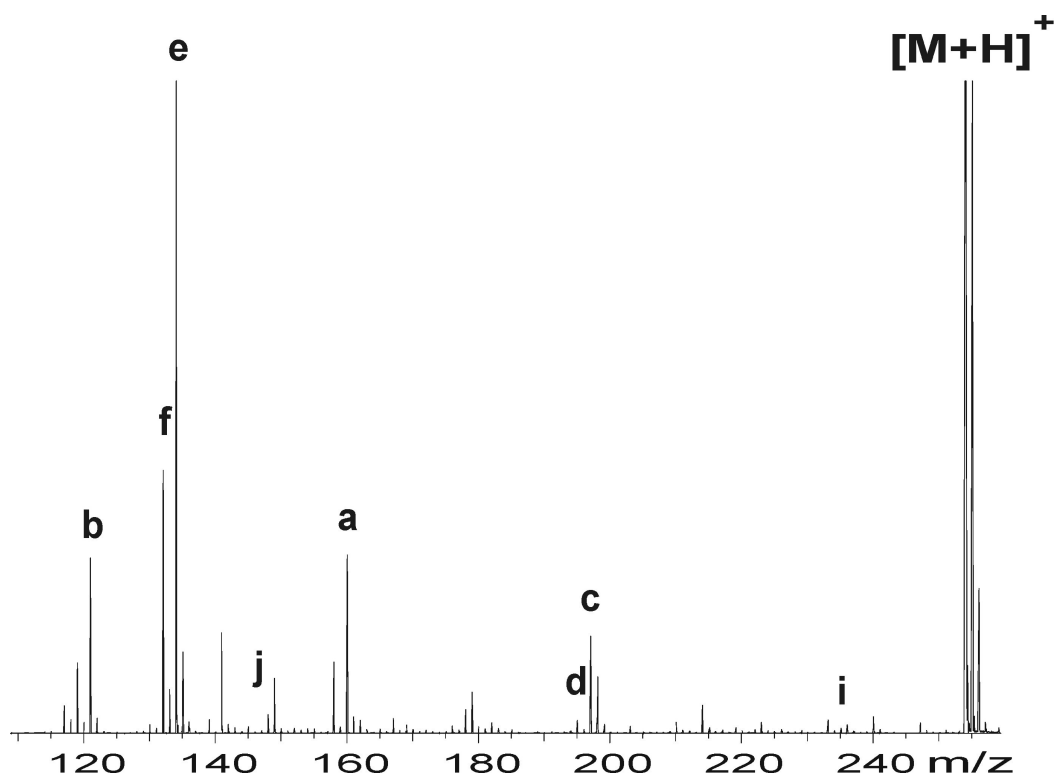
Minta	a	b	c	d	e	f	g	h
<u>1</u>	70.14 (70.07)	121.13 (121.12)	121.13 (121.16)	119.18 (119.14)	44.07 (44.08)	-	-	-
<u>2</u>	146.16 (146.17)	121.16 (121.12)	-	-	120.21 (120.17)	-	-	105.27 (105.16)
<u>3</u>	160.23 (160.20)	121.17 (121.12)	196.80 (197.26)	195.04 (195.24)	-	131.93 (132.19)	-	-
<u>4</u>	202.62 (202.28)	121.10 (121.12)	197.62 (197.26)	195.24 (195.24)	176.39 (176.28)	174.51 (174.27)	222.69 (223.25)	105.42 (105.16)
<u>5</u>	-	121.12 (121.12)	197.74 (197.26)	195.97 (195.24)	-	-	222.76 (223.25)	105.44 (105.16)
<u>6</u>	-	137.20 (137.18)	197.55 (197.26)	-	134.34 (134.20)	132.16 (132.19)	238.80 (239.32)	-
<u>7</u>	218.66 (218.34)	137.32 (137.18)	197.31 (197.26)	-	176.69 (176.28)	174.51 (174.27)	239.24 (239.32)	-

A fragmensek a benzoxazepin gyűrű hasadásából keletkeznek, a nitrogén és a C(5) atom, valamint az oxigén és a C(2) atom közötti kötés hasadásával az *e* és az *f* fragmensekhez jutunk, valamint a töltés elhelyezkedésétől függően a *b* fragmens is képződhet. Tapasztaltam $R_2-N=C=X$ molekula kihasadását is, amely a C(5a)–C(5) és a N–C(3) kötés hasadásával értelmezhető, és a *c* fragmens iont eredményezi. Ebből hidrogénmolekula veszéssel vagy a prekursor ionból $R_2-NH-CHX$ molekula kilépésével jutunk a *d* ionhoz. A 2., 4. és 5. minták esetében a sztiril-kation is megjelent a spektrumban (*h*), továbbá a prekursor ionból fenol kilépéssel az *a* fragmenshez, R_2-NH_2 eliminációval pedig a *g* fragmenshez jutunk. A 3. vegyülettől eltekintve a *g* fragmens minden esetben megjelent, ahol R_2 nem hidrogén volt.

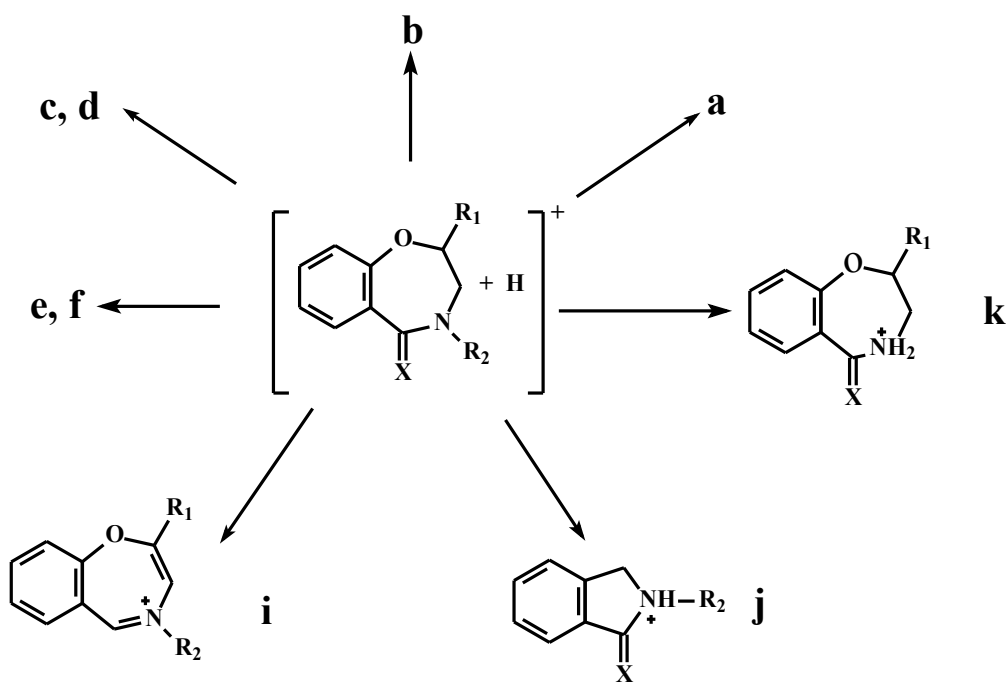
Az ESI-TOF MS spektrumokban, a MALDI spektrumokhoz hasonlóan, a protonnal képzett addukt ion intenzív csúcsot adott a tömegspektrumban. A kapillárisfeszültség növelésével fragmentációt idéztem elő, mivel ez nem valódi MS/MS technika, így fontos a vizsgált minták nagymértékű tisztasága. Ugyanis a spektrumban megjelenhetnek a fragmens ionok mellett olyan csúcsok is, amelyek nem a minta fragmentációjából származnak. Az általam vizsgált benzoxazepin-származékok, amelyek már a korábban említett módszerekkel voltak karakterizálva, megfelelően tiszták voltak az ESI-CID mérések elvégzéséhez.

A 3. minta ESI-CID spektruma a **23. ábrán** látható, amelyen a különböző fragmens ionok betűkkel vannak jelölve. Az **a-f** betűk a **22. ábrának** megfelelő szerkezeteket jelölik, azonban megjelenik néhány új fragmens ion is, amelyek szerkezetét a **24. ábra** mutatja be. ESI körülmények között az R_2 -csoport lehasadásával a *k* fragmens ion képződik kivéve, ha R_2 metil-csoport, valamint H_2X kilépésével az *i* fragmens ionhoz jutunk, amelyek megjelenését PSD körülmények között egyáltalán nem tapasztaltam. A C(9a)–O és a C(2)–C(3) kötések hasadásával a *j* ion keletkezik, amelyet szintén csak ESI körülmények között észleltem. Míg MALDI körülmények között a sztiril-kation (*h*) és a *g* fragmens megjelenése jellemző volt, addig ESI körülmények között ezt nem tapasztaltam. A 4. és a 7. minta esetében butil-kation jelent meg a spektrumban PSD körülmények között, míg ESI-CID esetében nem.

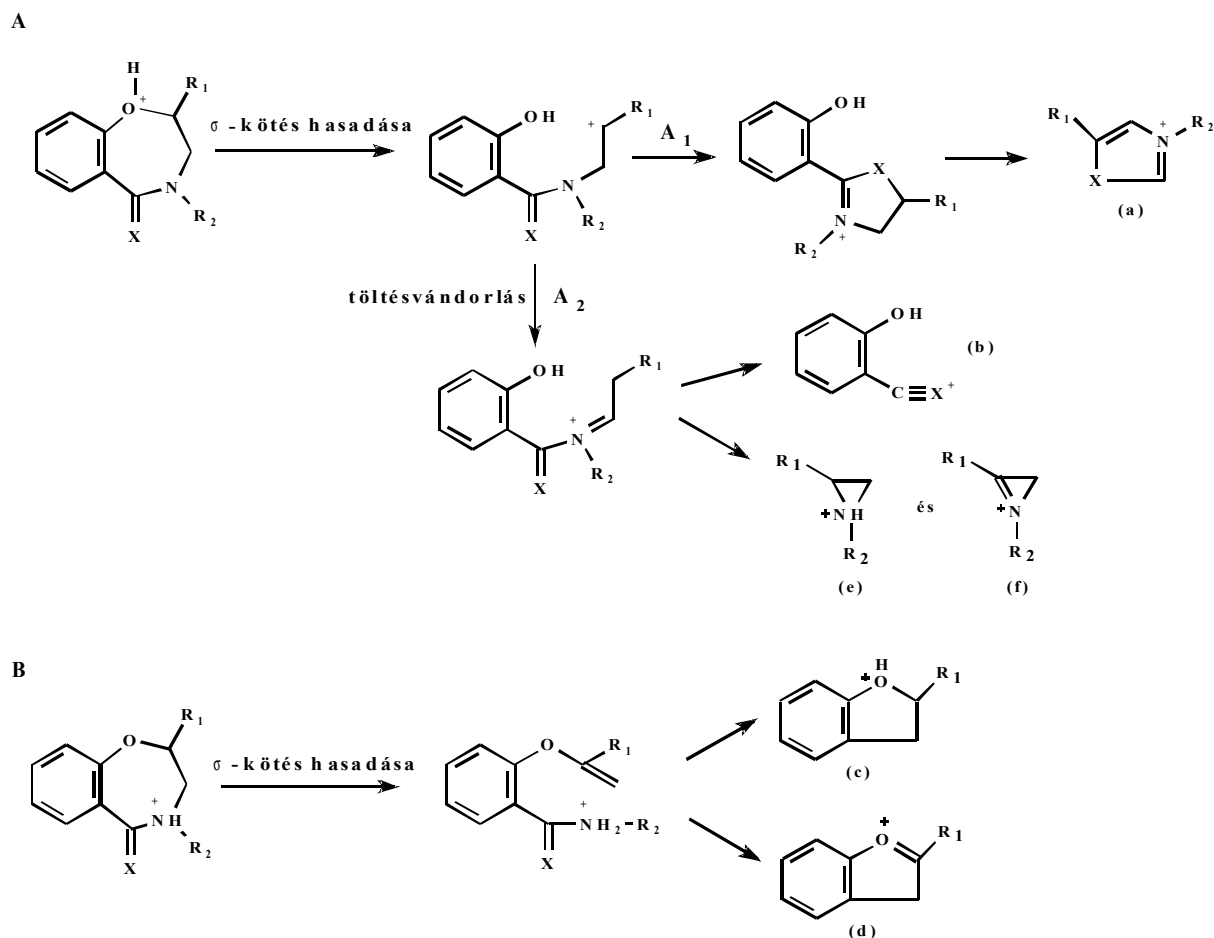
Mindezek figyelembe vételével az általam javasolt fragmentációs útvonalak a **25. ábrán** láthatók.



23. ábra
A 3. minta ESI-CID tömegspektruma



24. ábra
A benzoxazepinek bomlási sémája ESI-CID körülmények között



25. ábra
Javasolt fragmentációs útvonalak

A mérési eredmények alapján a fragmentáció a következőképpen megy végbe.

Az **A** esetben a proton az oxigénen helyezkedik el, majd az O–C(2) σ -kötés hasadásával egy nyílt láncú addukt ion keletkezik, ebből az A_1 útvonalon gyűrűzáródás és töltésvándorlás után az **a** fragmenshez jutunk. Az A_2 esetben töltésvándorlás során a pozitív töltés a nitrogénre kerül, majd ebből kötéshasadással – attól függően, hogy a töltés a hasadás után melyik molekulán helyezkedik el – a **b**, az **e** és az **f** fragmenseket kapjuk.

A **B** esetben a töltés a nitrogénatomon helyezkedik el, majd ebből a N–C(3) σ -kötés hasadásával egy nyílt láncú ion keletkezik, amiből R_2 –N=C=X és/vagy R_2 –NH–CHX molekulák kihasadásával a **c** és a **d** fragmenseket kapjuk.

Az **5. táblázatban** a benzoxazepin-származékok fragmenseinek mért és számított (zárójelben) tömegei láthatók. Megfigyelhető, hogy a tömegegyezés sokkal jobb, mint MALDI esetében. Míg az előbbi esetben a számított és a mért tömegek között néhány mDa az eltérés, addig az utóbbi esetben néhány száz mDa.

5. táblázat

Az azonosított fragmensek mért és számolt tömegei ESI-CID technika esetén

Sample	a	b	c	d	e	f	i	j	k
<u>1</u>	-	121.034 (121.028)	121.034 (121.065)	119.054 (119.049)	-	-	146.065 (146.060)	-	164.076 (164.071)
<u>2</u>	146.062 (146.060)	121.030 (121.028)	197.098 (197.096)	195.081 (195.080)	-	-	222.094 (222.091)	-	240.104 (240.102)
<u>3</u>	160.079 (160.076)	121.033 (121.028)	197.100 (197.096)	195.087 (195.080)	134.099 (134.096)	132.084 (132.081)	236.105 (236.107)	148.079 (148.076)	-
<u>4</u>	202.124 (202.123)	121.032 (121.028)	197.098 (197.096)	195.086 (195.080)	176.146 (176.143)	174.129 (174.128)	-	190.123 (190.123)	240.105 (240.102)
<u>5</u>	204.086 (204.066)	121.034 (121.028)	197.101 (197.096)	195.085 (195.080)	178.092 (178.086)	-	-	-	240.108 (240.102)
<u>6</u>	176.054 (176.053)	137.008 (137.006)	197.099 (197.096)	195.082 (195.080)	134.098 (134.096)	132.082 (132.081)	236.103 (236.107)	164.052 (164.053)	-
<u>7</u>	218.101 (218.100)	137.008 (137.006)	197.100 (197.096)	195.080 (195.080)	176.145 (176.143)	174.132 (174.128)	278.156 (278.154)	206.102 (206.100)	256.083 (256.079)

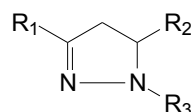
A kapott eredményekből látható, hogy mind a benzotiazepinek, mind a benzoxazepinek jól vizsgálhatók PSD-MALDI-TOF MS/MS és ESI-CID technika segítségével, valamint megfigyelhető, hogy a két módszer adott minta esetében különböző fragmentációt is szolgáltathat.

IV. 2.3. 1,3,5-triszubsztituált-2-pirazolin származékok vizsgálata

Ebben a fejezetben különböző pirazolin származékok fragmentációját mutatom be ESI-CID körülmények között. Az öttagú, nitrogéntartalmú, heterociklusos vegyületek között a különböző pirazolin származékoknak nagy jelentősége van, mivel fontos biológiai és gyógyszeres hatásokkal bírnak (antibakteriális, gombaölő és immunrendszer gyengítő hatásuk van, valamint ismert a központi idegrendszerre gyakorolt hatásuk is)¹⁴⁷⁻¹⁵¹. Ebből kifolyólag nagy számban szintetizáltak 2-pirazolin származékokat, valamint vizsgálták azok fragmentációját elektronionizáció segítségével¹⁵²⁻¹⁵⁵. Ezek a vegyületek könnyen előállíthatók α,β -telítetlen aldehidek vagy ketonok és hidrazin származékok reakciójával¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Munkám során kilenc különböző 1,3,5-triszubsztituált-2-pirazolin származék fragmentációját vizsgáltam elektroporlasztásos körülmények között. A vizsgált vegyületeket a következő táblázat foglalja össze (**6. táblázat**):

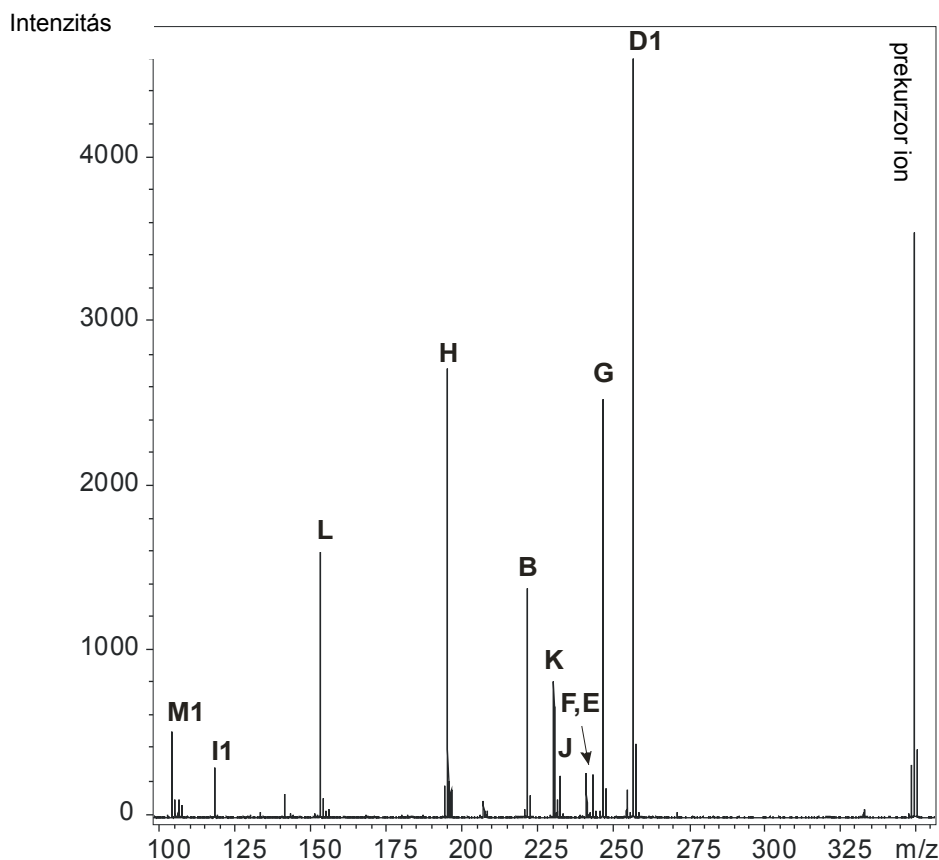
6. táblázat
A vizsgált 2-pirazolin származékok



	1	2	3	4	5	6	7	8	9
- R₁									
- R₂									
- R₃									

A fragmentáció tanulmányozására MS/MS méréseket végeztem, ekkor a Q1 kvadrupollal kiválasztottam a vizsgált származék proton adduktját, a Q2 kvadrupollal pedig fragmentációt idéztem elő. A fragmentációs mechanizmus feltérképezésére pseudo-MS³ méréseket végeztem. Ebben az esetben a kapilláris feszültség növelésével (CID) következett be a fragmentáció és az így keletkezett fragmens ionokat választottam ki a Q1 kvadrupollal. Azon származékok esetében, amelyek nem tartalmaztak oxigént, a tömegspektrumban gyakorlatilag csak a protonnal képzett addukt ion jelent meg, az oxigéntartalmúaknál emellett

megjelentek az $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ addukt ionok is. Minden esetben a fragmentáció vizsgálatára a protonnal képzett addukt iont választottam ki. Ennek eredményeképpen a következő MS/MS spektrumokat kaptam (26. ábra).



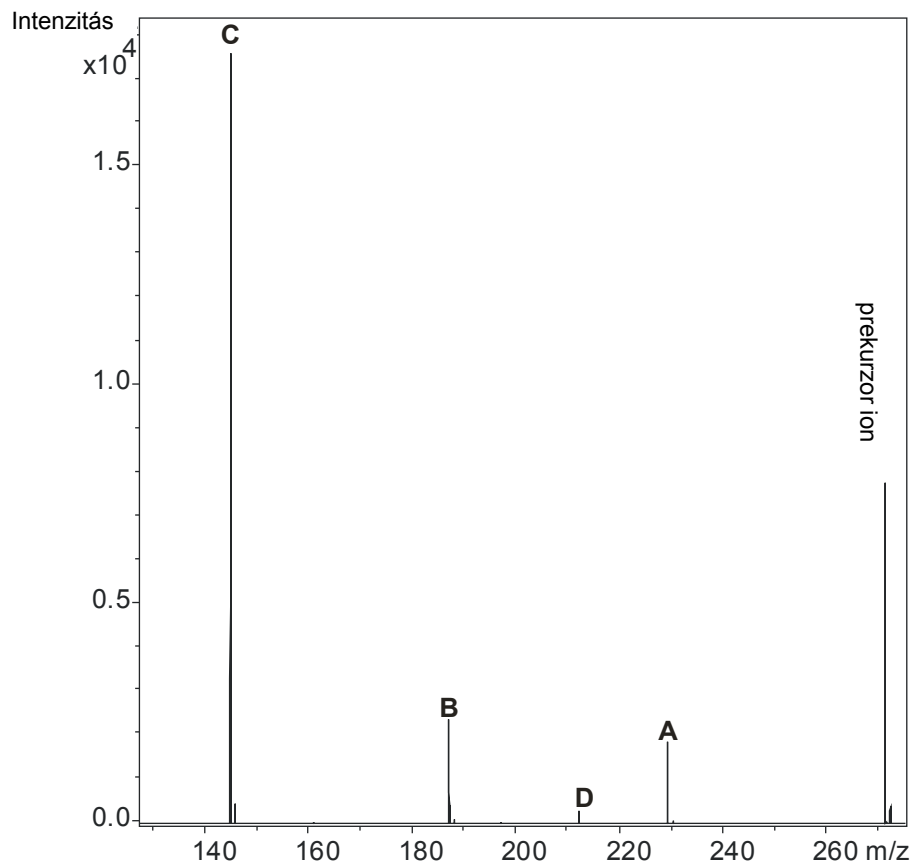
26. ábra

Az 1-es összetételű vegyület ESI-QqTOF MS/MS spektruma
(ütközési energia: 22 eV)

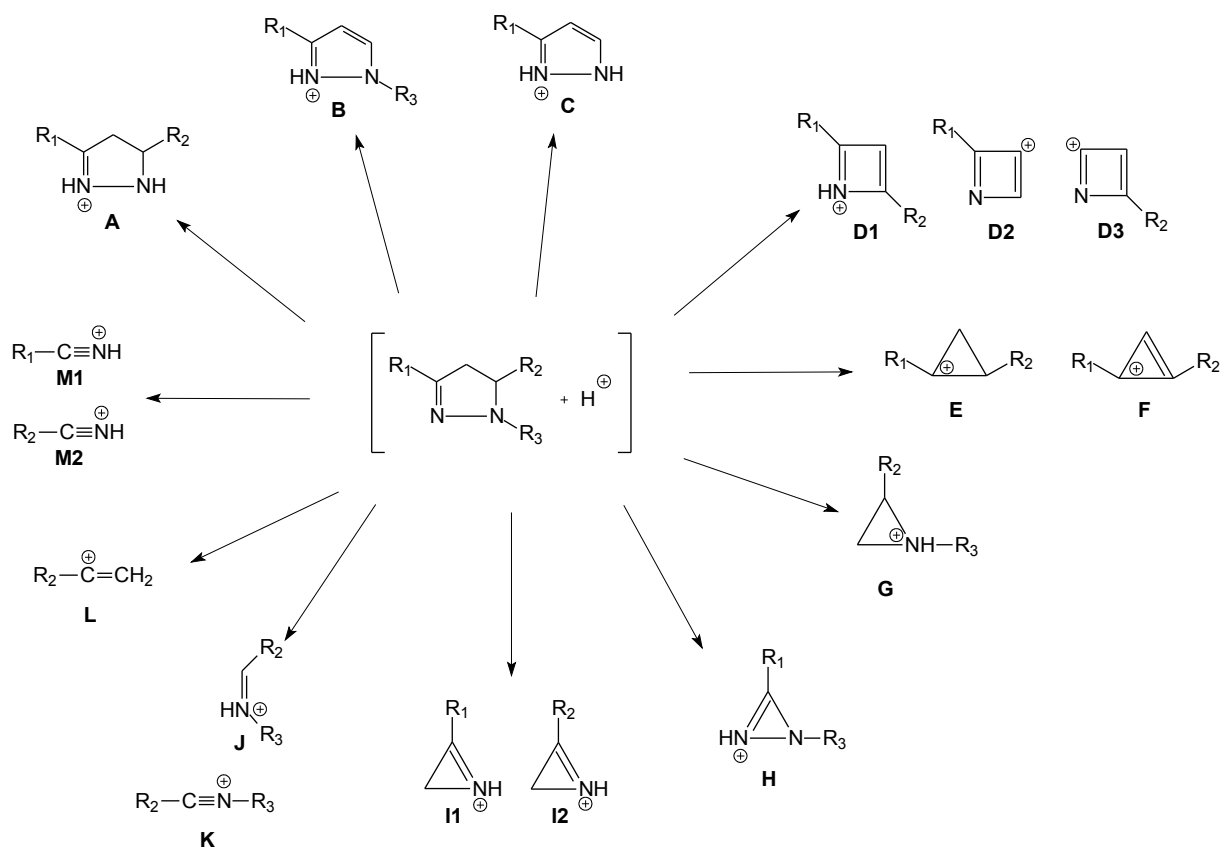
A 26. ábrán jól látható, hogy nagyszámú termékion képződött. Az azonosított termékeket különböző betűkkel jelöltem. Megfigyelhető, hogy az *A* és *C* jelű fragmens nincs feltüntetve. Ez azzal magyarázható, hogy a képződött fragmensek a pirazolin gyűrű hasadásával és/vagy az R_1 , R_2 , R_3 szubsztituensek lehasadásával keletkeztek. Ezek a szubsztituensek azonban jelentősen befolyásolták a fragmentációt, mivel pl. ha az R_3 -csoport fenil volt (mint ebben az esetben is), akkor az *A* és *C* fragmens nem jelent meg az MS/MS spektrumban, mert ez esetben az R_3 -csoportról egy hidrogénnek le kellett volna hasadnia, amely fenil szubsztituens esetében energetikailag kedvezőtlen. Ha az R_3 -csoport acetil vagy propenil volt, akkor ketén egység kihalásával könnyen képződhetett az *A* vagy a *C* termék ion. Ezen csoportok keténként történő távozása olyannyira kedvező volt, hogy a *G* fragmens

meg sem jelent az MS/MS spektrumban, valamint kis energiáknál, ezeknél a vegyületeknél, csak az *A*, *B*, *C*, *D* fragmens ionok jelentek meg (27. ábra).

Az egyes betűknek megfelelő szerkezeteket a 28. ábrán látható bomlási sémában tüntettem fel.



27. ábra
A 3-as minta MS/MS spektruma
(ütközési energia: 12 eV)



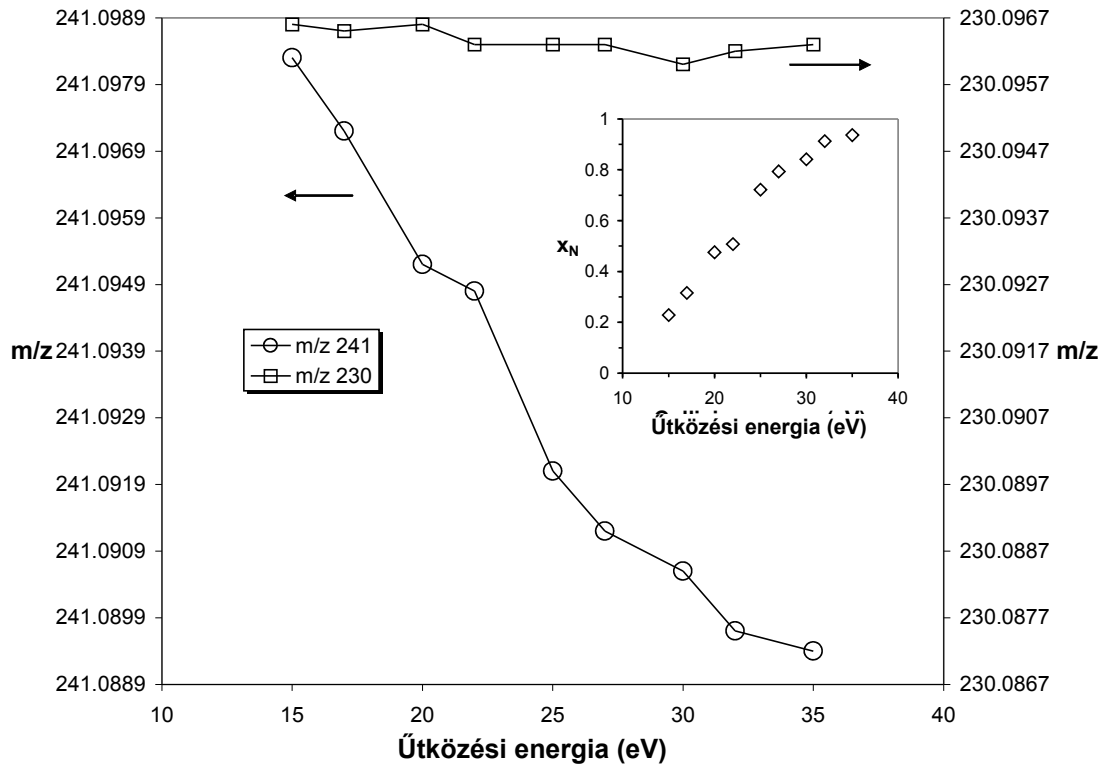
28. ábra

A vizsgált pirazolin származékok általános bomlási sémája

Az ütközési energia növelésével fokozatosan megjelentek a feltüntetett fragmens ionok. Az azonosított szerkezetek számított és mért tömegei nagy pontossággal megegyeztek, az MS/MS mérések tömegpontossága minden esetben 8 ppm alatt volt. A nagy tömegpontosság segítségével egyes szerkezeteket a tömegükből, szoftverrel számolt elemi összetételből határoztam meg, mivel ezen a pontosságon belül, ezekben az esetekben csak egy reális összetétel adódott. Pl. a 8-as minta esetében a *DI* fragmens ion mért tömege 256,1106, a szoftver a következő összetételeket javasolta $C_{16}H_{16}O_3$ (eltérés: -4,7 ppm), $C_{19}H_{14}N$ (eltérés: 5,8 ppm) és $C_4H_{10}N_{13}O$ (eltérés: 7,7 ppm). Mivel a 8-as minta protonnal képzett adduktjának összetétele $C_{25}H_{21}N_2$, így nyilvánvalóan csak a második összetétel jöhet számításba.

Az általános bomlási sémán megfigyelhető, hogy a képződött fragmensek páros elektronszámúak, amely egyébként általánosan is jellemző a lágy ionizációs technikákra, így az elektroporlasztásos technikára és a MALDI-ra is¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Egy esetben tapasztaltam gyök kation képződését, amely meglehetősen érdekesnek bizonyult. Azt tapasztaltam, hogy az *F* fragmension tömege az ütközési energia növelésével változik, azaz 15 eV esetén 241,0983-nak, 25 eV esetén 241,0921-nak adódott. Ha az *F* és a *K* ionok tömegeit ábrázolom az ütközési

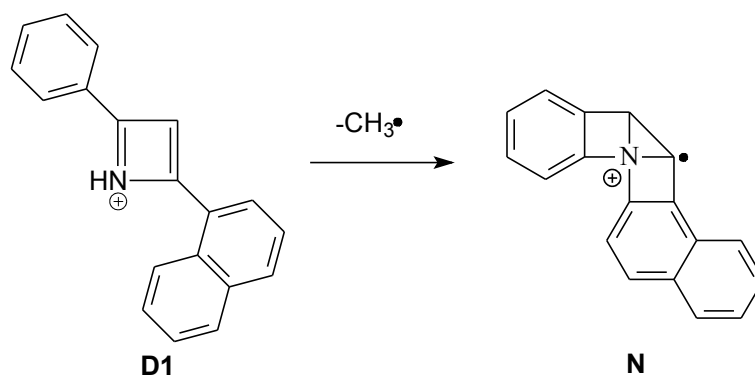
energia függvényében (**29. ábra**), akkor jól látható, hogy az F fragmens molekulatömege folyamatosan csökken, míg a K ion tömege közel konstans marad.



29. ábra

Az m/z értékek alakulása az ütközési energia függvényében a K és az F fragmensionok esetében

A változás a K esetében $\pm 0,0002$, az F esetében $0,0089$ az ütközési energia 15 eV-ről 35 eV-ra történő változtatása esetén. Ugyanakkor az is megfigyelhető volt, hogy az F -hez tartozó csúcs félérték szélessége főleg 20 - 25 eV között jóval nagyobb volt, mint az egyébként várható lenne. Figyelembe véve, hogy a tömegpontosság és a csúcs félérték szélessége az F fragmens esetén ilyen mértékben változik, arra a következtetésre jutottam, hogy egy másik szerkezet is megjelenik, amelynek a tömege közel akkora, mint az F ioné és ezáltal a spektrumban tömeg interferencia lép fel. A javasolt szerkezetet N -el jelöltem, amely a DI fragmensionból képződik metilgyök kihaladásával (**30. a. ábra**), az F és az N fragmens ionok megjelenését mutatja FT-ICR esetén a **30. b. ábra**.

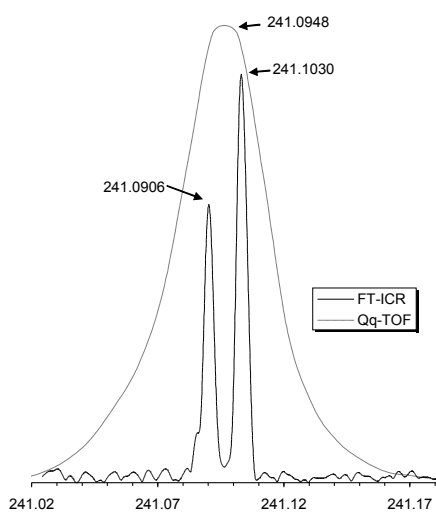


30. a ábra
Az *N* fragmens képződése a *DI* ionból

A 12. egyenlet felhasználásával könnyen kiszámítható, hogy különböző ütközési energiánál az *F* és az *N* fragmensek milyen hányadban vannak jelen:

$$m_C = x_F m_F + x_N m_N \quad (12)$$

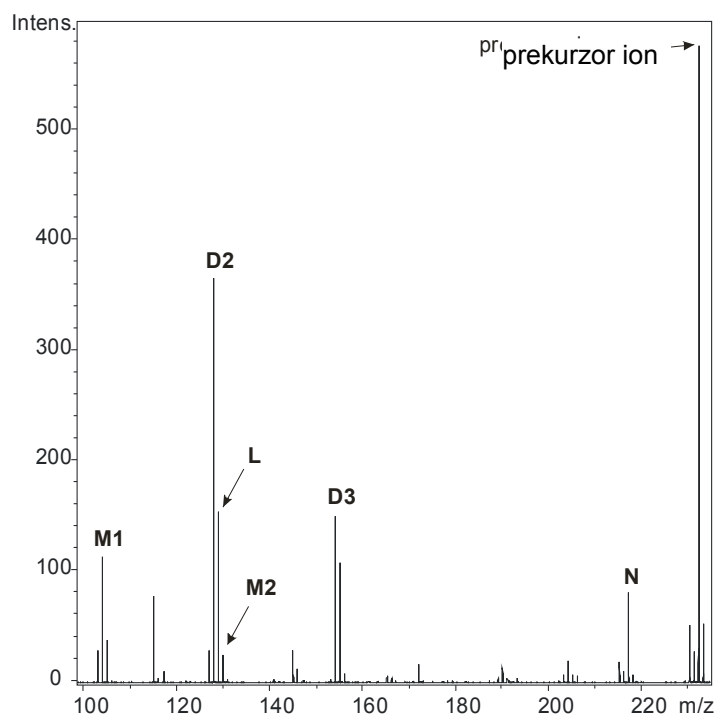
ahol m_C az adott ütközési energiánál megjelenő m/z érték, x_F és x_N moltiperek, m_F és m_N az *F* és az *N* fragmenshez tartozó m/z értékek¹⁶².



30. b. ábra
Az *F* és *N* fragmens ionok megjelenése FT-ICR esetén

A **29. ábra** jobb felső sarkában az x_N értékek változása látható az ütközési energia függvényében. Megfigyelhető, hogy nagyobb ütközési energiáknál inkább az *N*, kisebb ütközési energiáknál inkább az *F* fragmens van jelen. Hogy igazoljam az *N* gyökion *DI* fragmensből való képződését pseudo-MS³ mérést végeztem, mivel az *F* ion képződése a *DI*-ből irreálisztikus.

A **31. ábrán** a $D1$ -ről felvett pszeudo- MS^3 spektrum látható. Az egyes jelölések a **28. ábrán** szereplő szerkezeteknek felelnek meg, továbbá látható, hogy a spektrumban csak az N fragmens jelenik meg, vagyis kisebb energiáknál az F fragmens képződik közvetlenül a vizsgált minta protoncsúcsából, az energiát növelve a képződött $D1$ fragmens tovább fragmentálódik és így fokozatosan megjelenik az N gyök kation is.

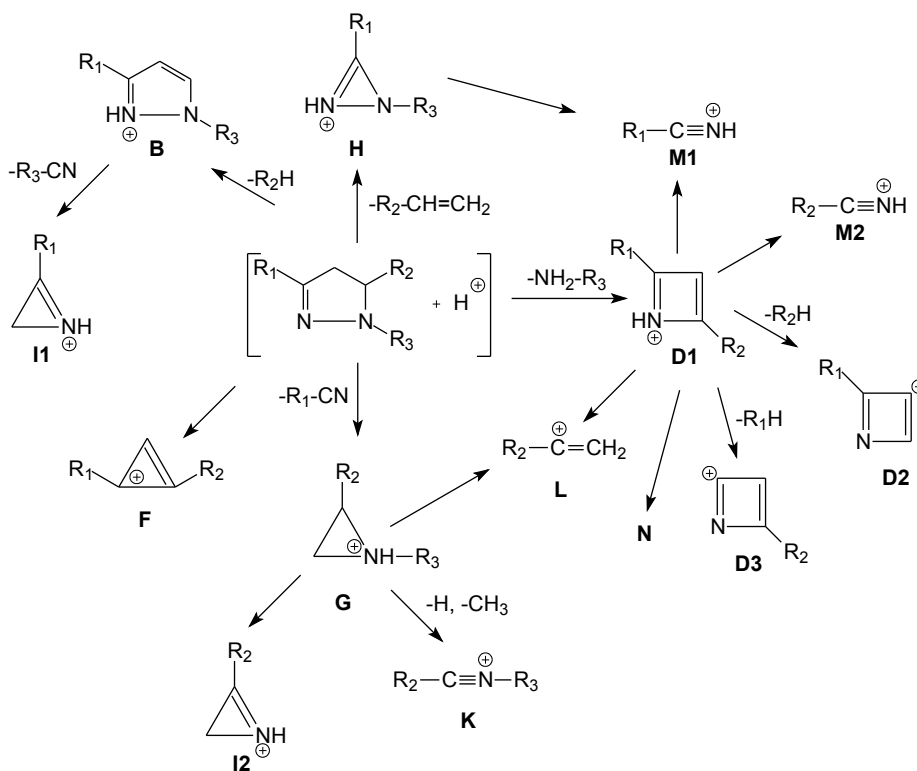


31. ábra
A $D1$ fragmens pszeudo- MS^3 spektruma

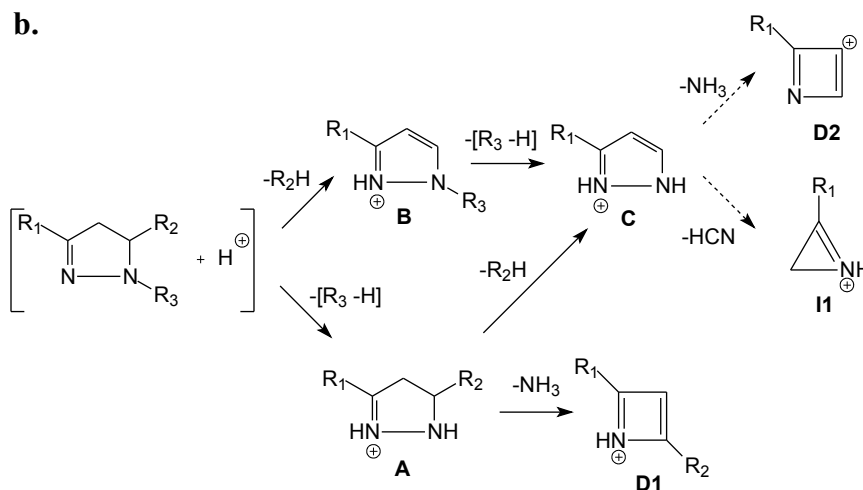
A fragmentációs útvonalakat pszeudo- MS^3 mérésekkel határoztam meg, melynek során azt tapasztaltam, hogy az R_3 -csoporttól függően ($R_3 =$ fenil vagy $R_3 =$ acetil, propionil) változik a fragmentáció. Ha az R_3 -csoport fenil, akkor a prekursor ion könnyen veszít R_1 -CN, R_3 -NH₂, R_2 -CH=CH₂ és RH_2 molekulákat, szolgáltatva ezzel az 1,2-szubsztituált-aziridin (G), a 2,4-szubsztituált-azetén ($D1$), az 1,3-szubsztituált-diazirin (H) és az 1,3-szubsztituált-pirazol (B) ionokat. Az F közvetlenül a prekursor ionból képződik, mivel egyetlen pszeudo- MS^3 spektrumban sem jelentkezett. Az energia növelésével a B , $D1$, G és H ionok tovább fragmentálódnak, a $D1$ -ből lehasadhat az R_1 vagy az R_2 -csoport ($D3$, $D2$), valamint képződhetnek az $M1$, $M2$ és L fragmensek a gyűrű felhasadásával, illetve metilgyök vesztéssel az N - párosítatlan elektront tartalmazó - kationhoz jutunk. A G fragmens bomlásával az $I2$, K és L szerkezeteket kapjuk. A H ionból az $M1$, a B -ből R_3 -CN kihasadással az $I1$ ion képződik. Amennyiben az R_3 acetil- vagy propionil-csoport, akkor kisebb

energiáknál az *A*, *B*, *C* és *D* fragmensek jelennek meg. A prekursor ionból R_2 -H vagy kétén kihaladásával a *B*, illetve az *A* fragmensek képződnek, mindkét fragmensből képződhet a *C* ion, illetve az *A*-ból ammónia kilépéssel a *D1*-hez jutunk. Amennyiben az energiát tovább növeljük a *C* fragmens ammóniát és hidrogén-cianid molekulát veszít, szolgáltatva ezzel a *D2* és *I1* fragmenseket. A **32. ábra a.** részében az előbbi fragmentációs útvonal, a **b.** részében az utóbbi fragmentációs útvonal van feltüntetve.

a.



b.



32. ábra

Javasolt fragmentációs útvonalak R_3 = fenil (**a.**) és R_3 = acetil, propionil (**b.**) szubsztituensek esetén

A következőkben a vizsgált származékok stabilitását hasonlítom össze.

A 2-pirazolin származékok fragmentációs stabilitásának összehasonlításához a fragmentációs hányadot (Φ) használtam:

$$\Phi = 1 - I_p / \sum I_i \quad (13)$$

ahol I_p a prekursor ion intenzitása, $\sum I_i$ a spektrumban megjelenő összes csúcs intenzitásának összege.

A relatív stabilitás meghatározásához azonban figyelembe kell venni a vizsgált származék tömegét, valamint a szabadsági fokok számát is, így ezekkel az értékekkel korrigálni kell.

Minden pirazolin származék esetében meghatároztam az $E_{1/2}$ értéket, amely az az ütközési energia, amelynél a $\Phi = 0,5$ (**33. ábra**). Az energiaértékeket a következő megfontolások figyelembe vételével korrigáltam.

Hogy egy adott molekula esetében a közölt energiának maximálisan mekkora hányada (f) alakulhat át belső energiává, az a következő egyenlettel adható meg:

$$f = m_g / (m_i + m_g) \quad (14)$$

ahol m_i az ion, m_g az ütközési gáz tömege.

Így a korrekciós faktor μ_m , amely a következő képlettel írható fel:

$$\mu_m = f / f_{ref} \quad (15)$$

ahol f_{ref} a referencia vegyületre vonatkozó energiahányad.

A második korrekciós tényező a mozgási szabadsági fokok száma (SzF), amely a következő kifejezéssel adható meg:

$$SzF = 3N - 6 \quad (16)$$

ahol N az atomok száma¹⁶³.

A szabadsági fokok növekedésével a kritikus kötésre jutott energiahányad csökken, így a fragmentáció valószínűsége is, ezáltal a korrekciós faktor a következőképpen alakul:

$$\mu_{SzF} = SzF_{ref} / SzF \quad (17)$$

ahol SzF a vizsgált molekula, SzF_{ref} a referencia szabadsági fokainak száma.

A két korrekciós faktor segítségével meghatározható a teljes korrekció (μ_t):

$$\mu_t = \mu_m \mu_{SzF} \quad (18)$$

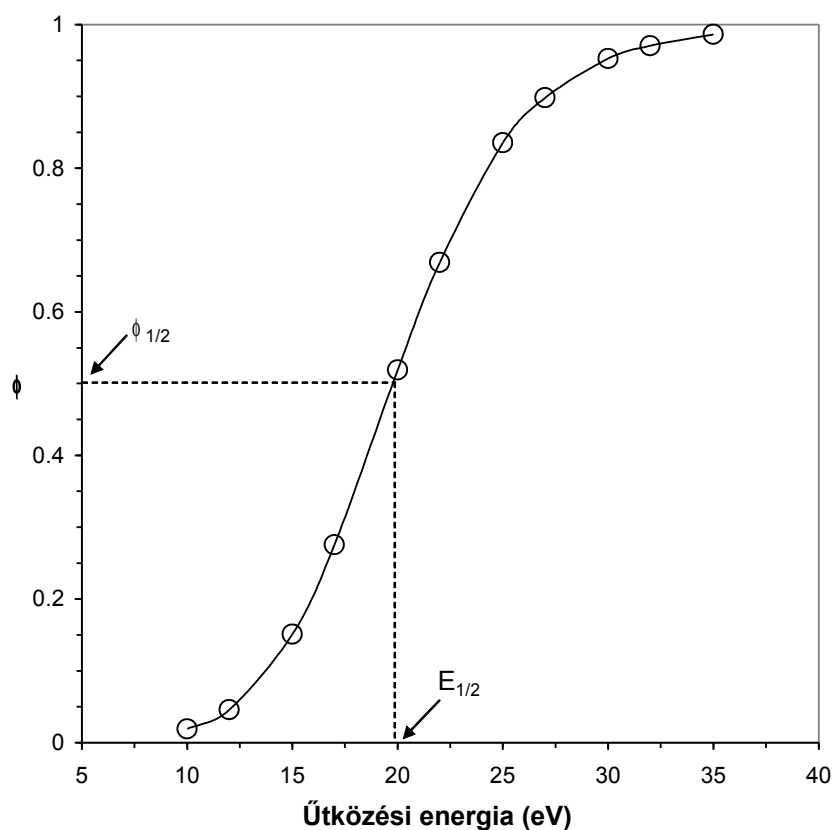
Ennek a tényezőnek a segítségével korrigálható az $E_{1/2}$ értékt ($E_{1/2,korr}$):

$$E_{1/2,korr} = \mu_t E_{1/2} \quad (19)$$

7. táblázat

A különböző származékok esetén meghatározott $E_{1/2}$ és $E_{1/2,korr}$ értékek

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
$E_{1/2}$ (eV)	18.0	19.5	7.0	14.6	7.0	14.9	17.1	17.9	12.2
$E_{1/2,korr}$ (eV)	9.9	12.0	7.0	11.3	5.4	9.2	7.0	9.9	7.4



33. ábra

Az $E_{1/2}$ érték meghatározása a 2. minta esetén

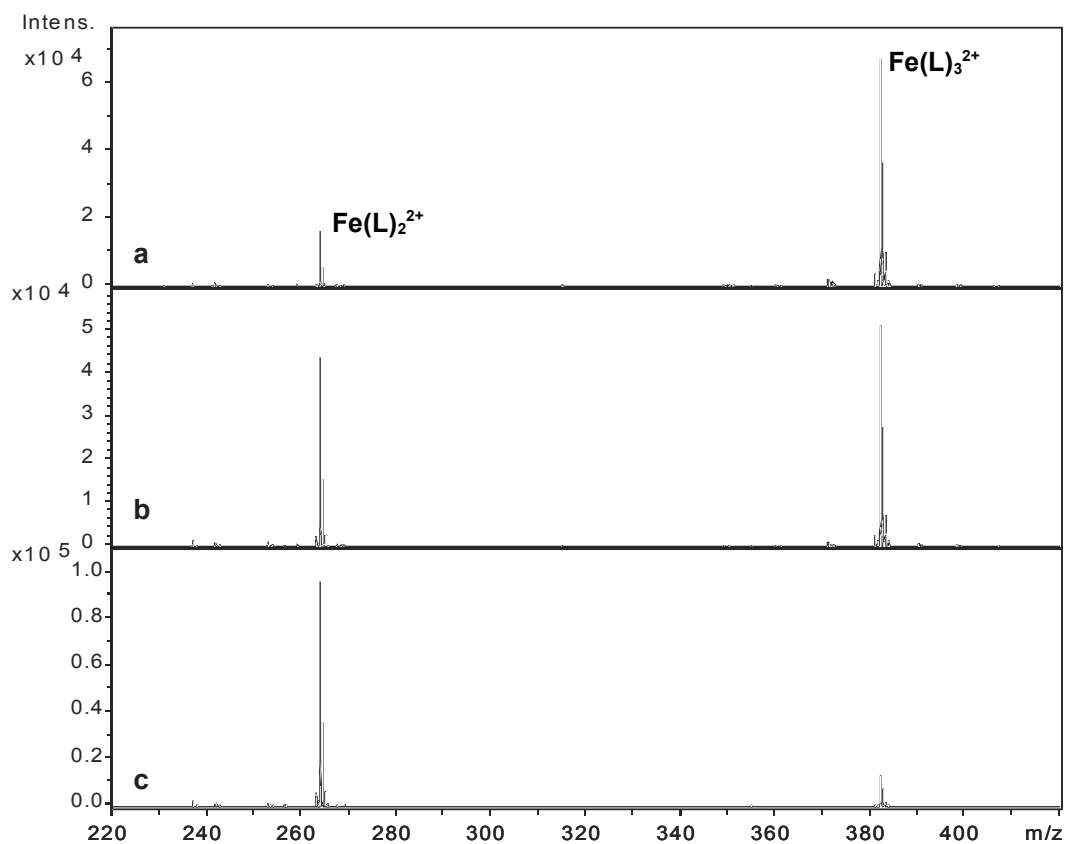
A 7. táblázat segítségével meghatározható a vizsgált pirazolin származékok fragmentációs stabilitása, amely a következő sorrendben változik:

$$\underline{5} < \underline{3} \sim \underline{7} < \underline{9} < \underline{6} < \underline{1} \sim \underline{8} < \underline{4} < \underline{2}$$

Megfigyelhető, hogy azon származékok, amelyek acetyl, vagy propionyl szubsztituenset tartalmaztak jóval kisebb energiával fragmentálhatók (3,5,7,9), amennyiben az N-1 helyen fenil-csoport van, a fragmentáció nagyobb energiát igényel. Érdekes továbbá, hogy a 2-es (1,5-difenil-3-sztiril-2-pirazolin) és a 6-os (1,3-difenil-5-sztiril-2-pirazolin) vegyületek egymással izomerek, a korrigált energiértékük mégis különbözik egymástól. Ez alapján úgy tűnik, hogy a C-3 és C-5 helyzetben lévő szubsztituensek a fragmentációs stabilitást nagymértékben befolyásolják. Másrészt viszont, ha a szubsztituensben kismértékű különbség van, mint az 1-es (1,3-difenil-5-(1-naftil)-2-pirazolin) és a 8-as (1,3-difenil-5-(2-naftil)-2-pirazolin) vegyületek C-5-ös szubsztituenseiben, a fragmentációs stabilitás gyakorlatilag nem változik.

IV. 2.4. Fe(II)-fenantrolin komplexek relatív stabilitásának meghatározása ESI-CID körülmények között

Azért esett ezen komplexekre a választás, mert stabilitásuk kellően nagy volt ahhoz, hogy a méréseket elvégezzem, valamint a Fe(II) komplexek gázfázisú stabilitása kevésbé ismert, a fenantrolin ligandumok pedig kelátképző tulajdonságaik miatt elterjedten használtak a koordinációs kémiában¹⁶⁵⁻¹⁶⁹. Ha a fémkomplexek gázfázisú stabilitását összehasonlítom az oldatfázisú stabilitással, akkor nagyobb rálátásunk lehet a komplexképződés mechanizmusára. Az általam használt ESI-MS készülékkel nem tudtam MS/MS mérést végezni, ezért a fragmentációhoz a bemeneti kapilláris és a szkimmer közötti feszültséget (V_{C-S}) változtattam. Ezáltal megnöveltem az ütközések számát a vizsgált komplexion és a háttérgáz részecskéi között. Az ütközések révén a kinetikus energia egy része belső energiává alakul, ezáltal megnövelve a fragmentáció valószínűségét. Ezzel a technikával a közölt belső energia mennyisége kontrollálható^{170,171}. A mérés során a szkimmer feszültsége állandó 40 V volt. A bemeneti kapilláris feszültségét pedig 45 V és 220 V között változtattam. A kapott tömegspektrumokat a **34. ábrán** tüntettem fel.



34. ábra

A tetrametil-fenantrolinnal képzett komplex ESI-CID spektruma
 $V_{C-S} = 80$ V (a), 95 V (b), 115 V (c)

A fragmentációs hányad (ϕ) a következő képlettel fejezhető ki:

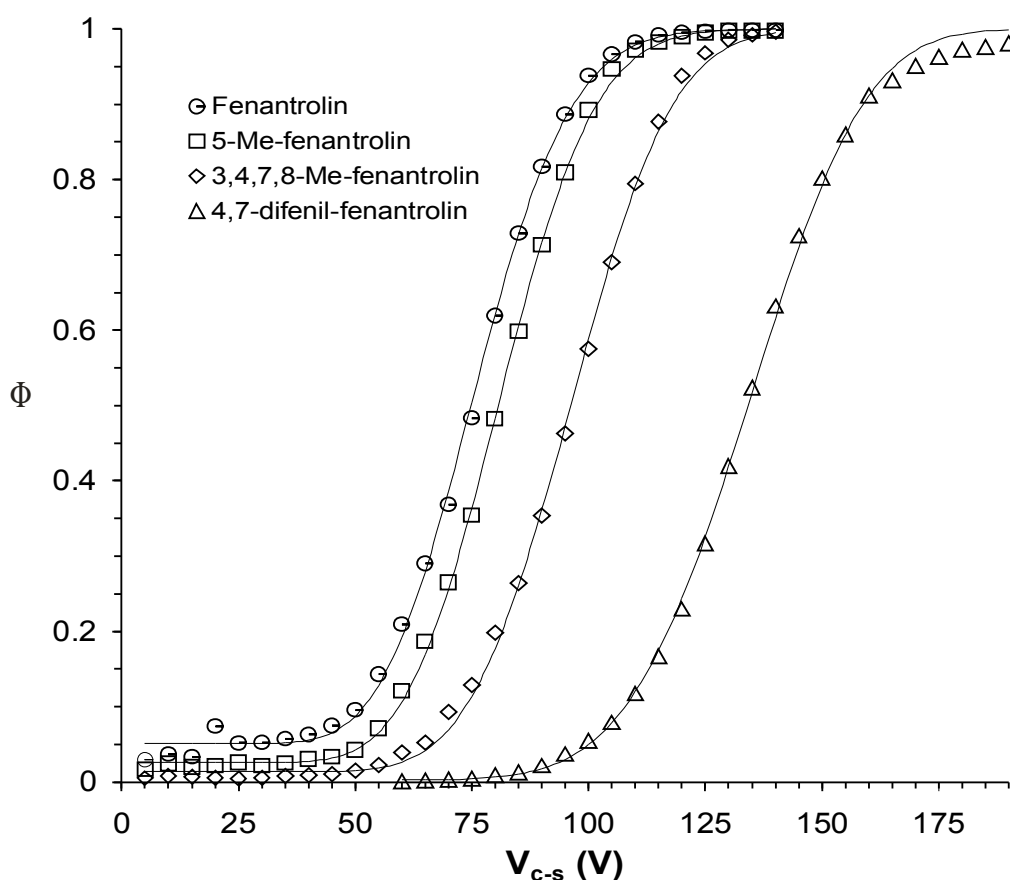
$$\phi = I_B / (I_T + I_B) \quad (20)$$

ahol I_B a bisz komplex, I_T a trisz komplex intenzitása.

A kapilláris feszültség növelésével a következő folyamat játszódik le:



A fragmentációs hányad feszültségkülönbségtől függő változását a különböző komplexek esetén a **35. ábra** mutatja.



35. ábra

A fragmentációs hányad (ϕ) függése a kapilláris - szkimmer közötti feszültségkülönbségtől (V_{c-s}) az egyes komplexek esetén

Megfigyelhető a **35. ábrán**, hogy kis V_{c-s} értékeknél a fragmentáció mértéke a következő sorrendben csökken: fenantrolin > 5-metil-fenantrolin > 3,4,7,8-tetrametil-fenantrolin > 4,7-difenil-fenantrolin. A kis ütközési energiáknál tapasztalt bomlások valószínűleg még a kapilláris szkimmer-régióba kerülése előtt bekövetkeznek, mivel az

ezután következő hexapolban az ütközések valószínűsége, ezáltal a fragmentáció valószínűsége kisebb.

A bomlás kinetikáját vizsgálva unimolekuláris disszociációt tételeztem fel, melynek sebességi állandója legyen k_0 , ekkor a következő összefüggés írható fel:

$$P = P_0 e^{-k_0 t_0} \quad (21)$$

ahol P_0 a komplexionok kezdeti száma, P a komplexionok száma t_0 időnél, t_0 pedig az az idő, amíg az ionok a kapilláris-szkimmer részhez érnek.

Ebben a régióban a gázmolekulákkal való ütközések révén megnő a belső energiájuk és fragmentálódnak. Ezen bomlás sebességi állandója legyen k , innen a detektorig való eljutáshoz szükséges idő pedig legyen t . Ezt figyelembe véve a (21)-es egyenlet így fog módosulni:

$$P = P_0 e^{-k_0 t_0 - kt} \quad (22)$$

Mivel $\phi = 1 - P/P_0$, így a (22). egyenletet felhasználva a fragmentációs hányad a következőképpen adható meg:

$$\phi = 1 - e^{-k_0 t_0 - kt} \quad (23)$$

Feltételezve, hogy a komplexion kezdeti belső energiája $E_{b,0}$, a kapilláris-szkimmer térrészben szerzett többletenergia pedig E_b , akkor a következő összefüggés írható fel:

$$E_{b,0} = sRT_0 \quad \text{és} \quad E_b + E_{b,0} = sRT \quad (24)$$

ahol s a szabadsági fokok száma, R az egyetemes gázállandó, T és T_0 a kapilláris-szkimmer térrészben és előtte lévő hőmérsékletek.

A (24). egyenlet felhasználásával k_0 és k sebességi állandóra a következő Arrhenius összefüggések írhatók fel:

$$k_0 = A \cdot e^{-sE_a/E_{b,0}} \quad \text{és} \quad k = A \cdot e^{-sE_a/(E_{b,0} + E_b)} \quad (25)$$

Feltételezve, hogy $E_b \gg E_{b,0}$, akkor a (25). egyenlet segítségével a (23). egyenletből ϕ kifejezhető:

$$\phi_{ARR}(E_b) = 1 - \exp[-A \cdot t_0 \cdot e^{-sE_a/E_{b,0}} - A \cdot t \cdot e^{-sE_a/E_b}] \quad (26)$$

Valószínűsítve továbbá, hogy a belső energia megnövekedése a V_{C-S} növekedésével arányosan változik, vagyis $E_b = \alpha V_{C-S}$, ahol α az arányossági tényező, a fragmentációs hányadot a (27). összefüggéssel is leírhatjuk:

$$\phi_{ARR}(V_{C-S}) = 1 - \exp[-a \cdot b \cdot e^{-sc/V_{C-S}}] \quad (27)$$

az a, b, c értékek konstansok: $a = A \cdot t_0 \cdot e^{-sE_a/E_{b,0}}$, $b = At$ és $c = E_a/\alpha$.

Az RRK modellt használva $k_0 = A(1-E_0/E_{b,0})^{s-1}$ és $k = A[1-E_0/(E_{b,0}+E_b)]^{s-1}$, ahol E_0 a fragmentációhoz szükséges kritikus energia.

Az előzőekhez hasonló levezetésekkel és feltételezve, hogy $E_b \gg E_{b,0}$, a fragmentációs hányadra a következő összefüggések írhatók fel:

$$\phi_{RRK}(E_b) = 1 - \exp[-At_0(1-E_0/E_{b,0})^{s-1} - At(1-E_0/E_b)^{s-1}] \quad (28)$$

$$\phi_{RRK}(V_{C-S}) = 1 - \exp[-a \cdot b(1-c/V_{C-S})^{s-1}] \quad (29)$$

ahol $a = At_0(1-E_0/E_{b,0})^{s-1}$, $b = At$ és $c = E_0/\alpha$.

A (27). és (29). egyenletekből az a, b, c értékek a kísérleti ϕ értékekre való illesztésekből kiszámíthatóak. A **35. ábrán** látható, hogy a mérési pontok jól egybeesnek az illesztett görbékkel. Az Arrhenius és az RRK modellből számolt a, b , és c értékek a **8. táblázatban** láthatók.

8. táblázat

Az illesztésekből számított a, b, c értékek az Arrhenius és az RRK modell esetén

	Arrhenius			RRK		
	a	b	c	a	b	c
Fen	5.21x10 ⁻² (3.62x10 ⁻³)	167.3 (16.4)	2.13 (0.04)	5.23x10 ⁻² (3.7x10 ⁻³)	155.9 (15.2)	2.09 (0.04)
5-Cl-Fen	3.75x10 ⁻² (2.7x10 ⁻³)	147.9 (10.4)	2.09 (0.03)	3.8x10 ⁻² (2.87x10 ⁻³)	138.2 (9.7)	2.04 (0.03)
5-Me-Fen	2.62x10 ⁻² (2.4x10 ⁻³)	250.8 (18.6)	2.15 (0.03)	2.65x10 ⁻² (2.5x10 ⁻³)	233.3 (17.4)	2.11 (0.03)
3,4,7,8-Me-Fen	1.36x10 ⁻² (3.2x10 ⁻³)	467.3 (55.1)	2.07 (0.04)	1.37x10 ⁻² (3.2x10 ⁻³)	437.3 (51.5)	2.03 (0.04)
4,7-fenil-Fen	2.74x10 ⁻³ (4.3x10 ⁻³)	1630 (240)	2.78 (0.05)	2.97x10 ⁻³ (4.2x10 ⁻³)	1510 (216)	2.73 (0.05)

Az α arányossági tényező meghatározásához a belső energiák értékeire is szükségünk van, amelyhez a következőket kell figyelembe venni.

A rugalmatlan ütközések során a kinetikus energia belső energiává alakul, a maximális belső energia mennyisége (E_t) a következőképpen adható meg:

$$E_t = m_g / (m_i + m_g) E_{kin} \quad (30)$$

ahol m_i és m_g a komplex ion és a gázmolekulák tömege, E_{kin} a kinetikus energia.

Mivel a kinetikus energiának csak egy hányada (η) alakul át belső energiává, így az átalakult energia (ΔE_b):

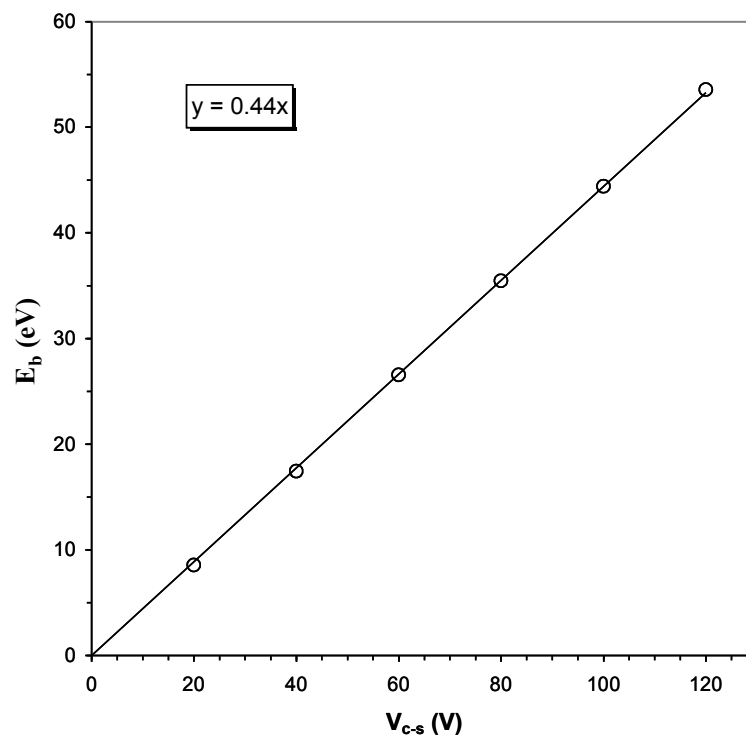
$$\Delta E_b = \eta E_t \quad (31)$$

Az ion két ütközés közötti belső energia növekedése a következőképpen adható meg:

$$\Delta E_{kin} = q\varepsilon\lambda \quad (32)$$

ahol q az ion töltése, ε a szkimmer és a kapilláris közötti elektromos mező térerőssége, λ pedig a szabad úthossz.

Ha $\eta = 0,5$, akkor ha a belső energiát ábrázolom a V_{c-s} függvényében lineáris összefüggéshez kapunk (**36. ábra**):



36. ábra

A belső energia V_{c-s} függése ferroin esetén

A **36. ábrán** megfigyelhető, hogy az egyenes meredeksége $\alpha = 0,44$ eV/V. Ha a többi komplex esetén ábrázoltam ezt az egyenest, akkor jó közelítéssel hasonló meredekséget

kaptam. Ennek a magyarázata, hogy a tömeg növekedésével a kinetikus energia belső energiává átalakult hányada csökken, másfelől az ütközési hatáskeresztmetszet a tömeg növekedésével nő, amely megnöveli az ütközések számát. Ez a két tényező egymással ellentétes hatású és közelítőleg kiegyenlítik egymást, ezzel magyarázható, hogy az E_b-V_{C-S} egyenesek meredeksége közelítőleg megegyezik. A hatáskeresztmetszetet a kötéstávolságokból számoltam, amelyet Chemoffice szoftverrel becsültem meg.

Mivel az egyenesek meredekségei, vagyis az α értékek, a különböző komplexek esetén közelítőleg megegyeznek, így a **8. táblázat** c paramétereinek felhasználásával meghatározható a komplexek gázfázisbeli relatív stabilitása: 4,7-difenil-Fen > Fen \approx 5-Cl-Fen \approx 5-Me-Fen \approx 3,4,7,8-Me-Fen.

A **9. táblázat** ezen komplexek oldatfázisbeli stabilitását mutatja.

9. táblázat

A komplexek oldatbeli $\log\beta_3$ értékei

	$\log\beta_3$
<i>Fen</i>	21.1
<i>5-Cl-Fen</i>	19.7
<i>5-Me-Fen</i>	21.9
<i>3,4,7,8-Me-Fen</i>	ismeretlen
<i>4,7-fenil-Fen</i>	21.7*

A gázfázisban mért tendencia közelítőleg megegyezik az oldatfázisbelivel, kivétel a 4,7-difenil-fenantrolin ligandum esetén, amely talán azzal magyarázható, hogy gázfázisban (oldószermentes környezetben) a fenil-csoportok elektronküldő hatása kifejezettebb. Továbbá a fragmentációhoz szükséges kritikus energia megbecsülhető a **8. táblázat** c paramétereinek segítségével, amely 4,7-fenil-fen esetén 1,2 eV, a többi komplex esetén 0,9 eV. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezen értékek nagymértékben függenek az η pontos értékétől, amelyet ezekben a számításokban 0,5-nek tételeztem fel.

V. Összefoglalás

Munkám során különböző kémiai szerkezetű anyagokat vizsgáltam MALDI-TOF és ESI-TOF tömegspektrometriával. Kihasnáltam, hogy bár ezek a módszerek lágy ionizációs technikák, kiválóan alkalmazhatóak fragmentáció vizsgálatára is, így a különböző kémiai rendszerekben lévő kölcsönhatások vizsgálatára PSD-MALDI-TOF MS/MS és ESI-CID méréseket végeztem.

Először a nanotechnológiában is fontos klaszterek különböző molekulákkal való kölcsönhatását tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy MALDI körülmények között ezüst-klaszttereket lehet előállítani. Kimutattam, hogy a minta ezüst ionnal történő ionizációja esetén a spektrumban megjelenik az $[M+Ag_3]^+$ addukt ion. Ezután a klaszter-molekula kölcsönhatást vizsgáltam, melyhez három különböző vegyületcsaládba tartozó anyagot használtam fel. A fragmentáció vizsgálata során legnagyobb kölcsönhatást, a diszulfid hidat tartalmazó vegyület esetén tapasztaltam. Bizonyítottam, hogy a klaszterion elektronszerkezete, ezáltal a stabilitása, nagymértékben változhat attól függően, hogy milyen molekulával van kölcsönhatásban.

Ezt követően kis molekulatömegű vegyületek fragmentációját tanulmányoztam három különböző vegyületcsaládba tartozó, fontos biológiai hatással rendelkező származékokon keresztül.

A benzotiazepinek esetén PSD-MALDI-TOF MS/MS méréseket végeztem, megállapítottam, hogy ezek a vegyületek MALDI körülmények között protonnal és ezüstionnal jól ionizálhatók. A kapott eredmények segítségével meghatároztam a benzotiazepinek bomlási sémáját, valamint a fragmentáció mechanizmusát, és bizonyítottam, hogy a bomlás mechanizmusa a kationizáló ágenstől is nagymértékben függ.

Benzoxazepinek esetén a PSD-MALDI-TOF MS/MS és az ESI-CID méréseket végeztem, megállapítottam, hogy MALDI és elektroporlasztásos körülmények között ezek a vegyületek jól vizsgálhatóak. Meghatároztam a bomlási sémát és a bomlás mechanizmusát. Megállapítottam, hogy a két módszer esetén bekövetkező bomlás, hasonló fragmentációt eredményez. Megfigyeltem azonban különbségeket is, például, ESI technika esetén az N-szubsztituált benzoxazepinek alként veszítenek, valamint H_2X (ahol $X=O$ vagy S) kihaladása is megfigyelhető, míg MALDI körülmények között ezek a fragmentációk nem jellemzőek.

A triszubsztituált-pirazolinokat ESI körülmények között tanulmányoztam. Megállapítottam, hogy ezzel a módszerrel ezek a vegyületek jól mérhetőek. MS/MS és pszeudo-MS³ mérésekkel feltérképeztem a fragmentációs útvonalakat. Kimutattam, hogy a

fragmentáció során gyök kation képződik, amely képződése elektroporlasztásos ionizáció esetén nem jellemző. Megállapítottam, hogy az N(1) nitrogénen lévő szubsztituens jelentősen befolyásolja a fragmentációt, valamint ha ez a szubsztituens acetyl vagy propionil csoport, akkor először ketén lehasadása megy végbe. Az eredmények ismeretében meghatároztam a pirazolin származékok fragmentációs stabilitását.

Munkám további részében Fe(II)-fenantrolin komplexek relatív gázfázisú stabilitását vizsgáltam ESI-CID technika segítségével. Megállapítottam, hogy a módszer jól alkalmazható megfelelő stabilitású komplexek vizsgálatára, annak ellenére, hogy hasonló méréseket, amelyekben fémkomplexek gázfázisú stabilitását vizsgálták volna ezzel a módszerrel, nem találtam az irodalomban. Kimutattam, hogy a fragmentáció során csak egy ligandum lehasadása történik meg, valamint igazoltam, hogy a fragmentáció elsőrendű kinetika szerint megy végbe és leírható az Arrhenius és a Rice-Ramsperger-Kassel modellekkel. Az eredmények ismeretében meghatároztam a fragmentációhoz szükséges kritikus energiát és a komplexek relatív gázfázisú stabilitását (4,7-Ph-Phen > Phen \approx 5-Cl-Phen \approx 5-Me-Phen \approx 3,4,7,8-Me-Phen).

VI. SUMMARY

In our work we deal with the investigation of different compounds by MALDI-TOF and ESI-TOF mass spectrometry. Although these methods are known as soft ionization techniques they can be applied to study the fragmentation as well (PSD-MALDI-TOF MS/MS, ESI-CID). Due to fragmentation we could gather more information on the interactions in different chemical systems.

In the first part of the dissertation the interactions between silver-cluster and three different organic molecules were studied under MALDI conditions. In every case the $[M+Ag_3]^+$ adduct ion appeared in the spectra. To investigate this adduct PSD MS/MS measurements were performed which pointed out that the electronic structure of the molecule had appreciable influence on the stability of the cluster adduct ion. It was found under MALDI conditions that several organic compounds which are able to produce adduct with silver ions, are also capable of forming adducts with Ag_3^+ cluster ions under appropriate conditions. Ag_3^+ cluster ion can be “in situ” generated under MALDI conditions from silver trifluoroacetate cationization agent in the presence of organic MALDI matrices. In this part the fragmentation of three different compounds including a commercial plasticizer, a peracetylated isoflavone glycoside and a pyrazolylphenyl disulfide derivative cationized with silver ions and Ag_3^+ cluster ions were compared. It was observed that the complexes of Ag_3^+ are less fragmented as compared to the corresponding adduct ions with silver. The presumable fragmentation channel of $[M+Ag_3^+]$ is the elimination of Ag_2 units from these complexes. No significant dissociation of $[M+Ag_3^+]$, into their building blocks, i.e. M and Ag_3^+ takes place indicating a tight connection between the corresponding molecule and the Ag_3^+ cluster ion. However, with a compound carrying very labile groups such as the pyrazolylphenyl disulfide derivative, intramolecular cleavages can occur prior to significant dissociation of the Ag_3^+ cluster ion.

Hereinafter the fragmentations of various molecules of small molar mass were investigated under MALDI and electrospray conditions. At first benzothiazepine derivatives were investigated which were ionized with proton and silver ions respectively. We observed a relationship between the fragmentation mechanism and the cationization agent. The fragmentation behavior of six tetracyclic 2,3-dihydro-1,5-benzothiazepine derivatives cationized with protons and silver ions under post source decay (PSD) matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) conditions is followed. The protonated adduct ions decompose into several structurally important fragment ions, including substituted

cyclopropane and benzothiazole cations. Elimination of Ag and H and/or AgH from the silver-cationized adduct ions of these ($[M+Ag]^+$) compounds was observed. It was also found that $[M+Ag]^+$ produced silver-depleted fragment ions exclusively. Based on the PSD results a fragmentation pathway is proposed for the $[M+H]^+$ and $[M+Ag]^+$ precursor ions.

As a continuation of our work benzoxazepines were fragmented under PSD-MALDI-TOF MS/MS and ESI-CID conditions. Both methods gave nearly the same fragmentations; some important differences are dealt with in this dissertation. Fragmentations of the protonated adduct ions $[M+H]^+$ of seven 1,4-benzoxapine derivatives were studied using the “post-source decay” matrix-assisted laser desorption/ionization (PSD MALDI) and electrospray nozzle-skimmer collision induced dissociation (ESI-CID) mass spectrometric methods. It was found that both methods generated mainly fragment ions arising from the cross-ring cleavages of the benzoxazepine ring. Similar fragment ions were generated under MALDI and ESI conditions, however, it was observed that the loss of the alkylene unit from the N-substituted benzoxazepine, and the loss of a H_2X molecule (where $X=O$ or S) are more preferred under ESI conditions. Based on the experimental results a mechanism is also proposed for the fragmentation of the oxazepines studied.

At last pirazolin derivatives were investigated by micro-TOFQ ESI-TOF mass spectrometer which was equipped with a TOF and a quadrupole analyzer this way real MS/MS and pseudo MS^3 measurements could be performed. The latter technique was necessary to determine the fragmentation pathways and to verify the formation of radical cations which wasn't characteristic under electrospray conditions. Fragmentations and fragmentation pathways of the protonated adduct ions $[M+H]^+$ generated from electrosprayed solutions of nine 1,3,5-trisubstituted 2-pyrazoline derivatives were studied using energy-variable collision-induced dissociation (CID) and pseudo- MS^3 (in-source CID combined with MS/MS) methods. It was shown that under CID conditions several structurally important fragment ions such as 2,4-substituted azete and 1,2-substituted aziridine ions were formed. The composition of the fragment ions was unambiguously supported by accurate mass measurement (mass accuracy was within 8 ppm). The fragmentation pathways of 1,3,5-trisubstituted 2-pyrazolines were established by means of pseudo- MS^3 . It was found that a substituent at the N-1 position greatly affects the fragmentation pathways of the 2-pyrazoline derivatives. 1-Acetyl- and 1-propionyl-2-pirazole dissociate mainly through the formation of a pyrazolium cation, while in the case of 1-phenyl-2-pirazole derivatives product ions arising from the consecutive fragmentation of 2,4-substituted azete and 1,2-substituted aziridine ions dominate. Another interesting finding is the formation of a radical cation from the 2,4-substituted azete by loss of

a methyl radical. The fragmentation yield as a function of the collision energy for each of the 1,3,5-trisubstituted 2-pyrazolines was determined. Based on the fragmentation yield *versus* collision energy curves the relative fragmentation stability for the 1,3,5-trisubstituted 2-pyrazoline derivatives were also evaluated.

Henceforth different Fe(II)-phenanthroline complexes were studied by ESI-CID technique. The method was very simple and fast to determine relative stabilities of complexes in the gas phase but we were the first who applied this technique. The stability of these complexes is very important because this technique can't be applied for complexes of stability because they are fragmented immediately. Phenanthroline ligands were selected for this study because they are among the most utilized chelating agents in coordination chemistry forming stable complexes with Fe^{2+} ions in solution. The gas phase stabilities of $\text{Fe}(\Phi)_3^{2+}$ complexes, where Φ represents the 1,10-phenanthroline, 5-chloro-1,10-phenanthroline, 5-methyl-1,10-phenanthroline, 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ligands were investigated by collision-induced dissociation (CID) in the capillary-first skimmer region upon changing the voltage difference between the capillary and the skimmer. The loss of only one ligand from the $\text{Fe}(\Phi)_3^{2+}$ complexes was observed with each of the phenanthroline ligands studied. An increase in the voltage difference between the capillary and the skimmer resulted in a higher fragmentation yield as calculated from the intensity of the precursor and the fragment ion. The fragmentation yield *versus* capillary-skimmer voltage difference plots were evaluated by means of the Arrhenius and the Rice-Ramsperger-Kassel (RRK) model, by fitting the model parameters to the experimental data. Both models yielded practically the same results. In addition, if the internal energy gained through the capillary-skimmer region is estimated correctly, the approximate value of the critical energy (activation energy) for fragmentation can be extracted from the fragmentation yield *versus* capillary-skimmer voltage difference plots. It was found that the gas phase stabilities of the $\text{Fe}(\Phi)_3^{2+}$ complexes are nearly identical except for the more stable Fe(II)-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline complex. The critical energy for fragmentation was estimated to be approximately 1.2 and 0.9 eV for the Fe(II)- 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline and the other complexes, respectively.

VII. Irodalomjegyzék

1. Falconer, I.: *J. J. Thomson's Work on Positive Rays 1906-1914, Historical Studies in the Physical and Biological Sciences* **18**, 265 (1988).
2. *Nobel Lectures, Chemistry 1922*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, (1966).
3. Svec; Harry J.: *Mass Spectroscopy-Ways and Means: A Historical Prospectus*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes **66**, 3 (1985).
4. Davis, R.; Frearson, M.: *Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, Chichester, England, 603 (1987).
5. McLafferty, F. W.; Turecek, F.: *Interpretation of Mass Spectra*, (4rd Ed.), University Science Books, Mill Valley, CA. (1993).
6. Munson, M. S. B; Fields, F. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2621 (1966).
7. Field, F. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrum.*, **1**, 277 (1990).
8. Harrison, A.G.: *Chemical Ionization Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, (2nd Ed.) (1992).
9. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Elliot, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.: *Anal. Chem.*, **54**, 645A (1982).
10. Surman, D. J.; Vickerman, J. C.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 325 (1981).
11. Aberth, W.; Straub, K. M.; Burlingame, A. L.: *Anal. Chem.*, **54**, 2029 (1982).
12. Fenselau, C.; Cotter, R. J.: *Chem. Rev.*, **87**, 501 (1987).
13. Davidian, T.; Thivel, P. M.; Hausseguy, G.; Mercier, S.; Laloue, N.: *Field Ionization, Field Desorption and Plasma Desorption Mass Spectrometry*.
www.cpe.fr/ciufolini/fd.htm.
14. Bruins, A. P.: *Trac-Trends Anal Chem*, **13**, 37 (1994).
15. Bruins, A. P.: *Trac-Trends Anal Chem*, **13**, 81 (1994).
16. Garcia, D. M.; Huang, S. K.; Stansbury, W. F.: *J Am Soc Mass Spectrom*, **7**, 59-65 (1996).
17. Voyksner, R. D.: *Environ Sci Technol*, **28**, 118A (1994).
18. Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Horning, E. C.; Stillwell, R. N.: *Appl. Spectrosc. Rev.*, **17**, 337 (1981).
19. Syage, J. A.; Hanold, K. A.; Lynn, T. C.; Horner, J. A.; Thakur, R. A.: [*Journal of Chromatography A*](#), **2**, 137 (2004).
20. Arpino, P.: *Mass Spectrom. Rev.*, **9**, 631 (1990).

21. Yamashita, M.; Fenn, J. B.: *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
22. Karas, M.; Bachman, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F.: *Int. J. Mass Spectrum. Ion Processes*, **78**, 53 (1987).
23. Brunnee, C.: *Int. J. Mass Spectrum. Ion Processes*, **76** (2), 125 (1987).
24. Cooks, R. G.; McLuckey, S. A.; Kaiser, R. E.: *Chemical and Engineering News*, **69** (12), 26, (1991).
25. Paul, W.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **29**, 739 (1990).
26. Stephens, W.I.: *Phys. Rev.*, **69**, 691 (1946).
27. Asamoto, B. (Ed.): *Analytical Applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, VCH Publishers, New York (1991).
28. Stafford, G. C. Jr.; Kelley, P. E.; Syka, J. E. P.; Reynolds, W. E.; Todd, J. F. J.: *Int. J. Mass Spectrum. Ion Processes*, **60**, 85 (1984).
29. Louri, J. N.; Cooks, R. G.; Syka, J. E. P.; Kelley, P. E.; Stafford, G. C. Jr.; Todd, J. F. J.: *Analytical Chemistry*, **59**, 1677 (1987).
30. Dinya, Z.: *Szerves Tömegspektrometria*, DE Kossuth Egyetemi Kiadó (2001).
31. Dietz, L.A.: *Electron multiplier-ion detector system*, US 3898456; PAT-APPL-491,988 (1975).
32. Lobe, P.; Nief, G.: *Electron Multiplier for the Measurement of an Ion Current on a Mass Spectrometer*, CEA-692 (1957).
33. Koyama, K.; Connally, R. E.: *Rev. Sci. Instr.*, **28** (1957).
34. Daly, N. R.: *Rev. Sci. Instr.*, **31** (1960).
35. Daly, N. R.: Positive Ion Detector, US 3041453 (1962).
36. Daly, N. R.: *Rev. Sci. Instr.*, **34** (1963).
37. Daly, N. R.; Powell, R. E.; Ridley, R.G.: *Nucl. Instr. Methods*, **36** (1965).
38. Ruggieri, D. J.: *IEEE Trans. Nucl. Sci.* NS-19, **3**, 74 (1972).
39. Dhawan, S.; Majka, R.: *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **24**; 23 (1977).
40. Chapman, J. R.: *Computers in Mass Spectrometry*, Academic Press, London (1978).
41. Munro, R.; Young, W. A. .P.; Hayes, R.; Hardy, R. W. D.; Wilson, H. W.; Ridley, R.G.: *Advance. Mass Spectrometry*, **3** (1966).
42. Ciupek, J. D.: *Tandem mass spectrometry: applications and new instrumentation*, Thesis, (1984).
43. Glish, G. L.; Goeringer, D. E.: *Anal. Chem.*, **56**, 2291 (1984).
44. McLafferty, F. W.; Amster, I. J.: *International Jnl. of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **72**, 85 (1986).

45. McLafferty, F. W.: *Science*, **214**, 280 (1981).
46. Yost, R. A.; Fetterolf, D. D.: *Mass Spectrometry Reviews*, **2**, 1, (1983).
47. Karas, M.; Hillenkamp, F.: *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301 (1988).
48. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
49. Overberg, A.; Karas, M.; Bahr, U.; Kaufmann, R.; Hillenkamp, F.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **4**, 293 (1990).
50. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*, **78**, 53 (1987).
51. Beavis, R. C.; Chait, B. T.: *Methods in Enzymol.*, **270**, 519 (1996).
52. Coligan, J. E.; Dunn, B. M.; Ploegh, H. L.: "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass analysis of peptides". Speicher, D. W. and Wingfield, P.T. Eds. (Contributed by William J. Henzel and John T. Stults), *Current Protocols in Protein Science*, **1**, John Wiley & Sons, New York, Unit 16.2. (1995).
53. Watson, E.; Shah, B.; DePrince, R.; Hendren, R. W.; Nelson, R.: *BioTechniques*, **16**, 178 (1994).
54. Belu, A. M.; DeSimone, J. M.; Linton, R. W.; Lange, G. W.; Friedman, R. M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **7**, 11 (1996).
55. Kéki, S.; Bodnár, I.; Borda, J.; Deák, G.; Zsuga, M.: *J. Phys Chem. B*, **105**, 2833 (2001).
56. Kéki, S.; Bodnár, I.; Borda, J.; Deák, G.; Batta, G.; Zsuga, M.: *Macromolecules*, **34**, 7288 (2001).
57. Kéki, S.; Török, J.; Deák, Gy.; Zsuga, M.: *Macromolecules*, **34**, 6840 (2001).
58. Danis, P.O.; Karr, D. E.; Xiong, Y.; Owers, K. G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 82 (1996).
59. Schriemer, D. C.; Li, L.: *Anal. Chem.*, **68**, 2721 (1996).
60. Danis, P. O.; Karr, D.E.: *Org. Mass Spectrom.*, **28**, 923 (1993).
61. Montaudo, G.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 453 (1995).
62. Rashidzadeh, H.; Guo, B.: *Anal Chem.*, **70**, 131 (1998).
63. Hoberg, A.M.; Haddleton, D.M.; Derrick, P.; Jackson, A. T. Scrivens, J. H.: *Eur. Mass Spectrom.*, **4**, 435 (1998).
64. Juhász, P.; Costello, C. E.; Biemann, K.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **4**, 399 (1993).
65. Vertes, A.; Levine, R.D.: *Chem. Phys. Lett.*, **171**, 284-290 (1990).
66. Johnson, R. E.; Sundquist, B. U. R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **5**, 574 (1991).

67. Dale, M. J.; Knochenmuss, R.; Zenobi R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 136 (1997).
68. Wiely, W.C.; McLaren, I.H.: *Rev. Sci. Instrum*, **26**, 1150 (1955).
69. Mamyrin, B. A.; Schmikk, D. V.; Zagulin, V. A.: *Soviet Phys. JEPT.*, **37**, 45 (1973).
70. Ingendoh, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **131**, 345 (1994).
71. Goudsmit, S. A.: *Physical Review*, **74** (1948).
72. Brown, R. S.; Lennon, J. J.: *Anal. Chem.*, **67**, 1998 (1995).
73. Vestal, M. L., Juhasz, P.; Martin, S. A.: *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **9**, 1044 (1995).
74. Brown, R. S.; Lennon, J. J.; Christie, D.: *Desorption '94*, Sunriver Lodge, OR, March 27, p. 63. (1994).
75. Lennon, J. J.; Brown, R. S.: *42nd ASMS Conf. On Mass Spectrom.*, 501. (1994).
76. Lennon J. J.: *Anal. Chem.*, **67**, 1998 (1995).
77. Colby, S. M.; King, T. B.; Reilly, J. P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 865 (1994).
78. Whittal, R. M.; Li, L. *Anal. Chem.*, **67**, 1950 (1995).
79. Chapman, J. R.: *Methods in Mol. Biol.*, **61** (1996).
80. Zenobi, R.; Knochenmuss, R.: *Mass Spectrom. Rev.*, **17**, 337 (1999).
81. Dale, M.; Knochenmus, R.; Zenobi, R.: *Anal. Chem.*, **68**, 3321 (1996).
82. Sunner, J.; Dratz, E.; Chen, Y.: *Anal. Chem.*, **67**, 4335 (1995).
83. Schurenberg, M.; Dreisewerd, K.; Hillenkamp, F.: *Anal. Chem.*, **71**, 221 (1999).
84. Sze, E. T. P.; Chan, T. W. D.; Wang, G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9**, 166 (1998).
85. Zhao, S.; Somayajula, K. V.; Sharkey, A. G.; Hercules, D. M.; Hillenkamp, F.; Karas, M.; Ingendoh, A.: *Anal. Chem.*, **63**, 450 (1991).
86. Li, L.; Golding, R. R.; Whittal, R. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11662 (1996).
87. Hensel, R. R.; King, R. C.; Owens, K. G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1785 (1997).
88. Hanton, S.; Clark, P.; Owens, K.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 104 (1999).
89. Hensel, R. R.; King, R. C.; Owens, K. G.: *Proceedings of the 43rd Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*; Atlanta, GA, May 21-26, p. 947 (1995).
90. Axelsson, J.; Hoberg, A-M.; Waterson, C.; Myatt, P.; Chield, G. L.; Varney, J.; Haddleton, D. M.; Derrick, J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 209 (1997).
91. Zhang, H.; Caprioli, R.: *JMS Letters, J. Mass Spectrom.*, **31**, 690 (1996).

92. Weinberger, S. R.; Boernsen, K. O.; Finchy, J. W.; Roberstson, V.; Musselman, B. D.: *Proceedings of the 41th Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, May 31-June 5, p. 7 (1993).
93. Cohen, S.; Chait, B. T.: *Anal. Chem.*, **68**, 31 (1996).
94. Dai, Y. Q.; Whittal, R. M.; Li, L.: *Anal. Chem.*, **71**, 1087 (1999).
95. Edmonson, R. D.; Russell, D. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **7**, 995 (1996).
96. Onnerfjord, P.; Ekstrom, S.; Bergquist, J.; Nilsson, J.; Laurell, T.; Marko-Varga, Gy.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 315 (1999).
97. Xiang, F.; Beavis, R. C.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 199 (1994).
98. Zhou, J.; Lee, T. D.: *Proceedings 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Atlanta, GA, May 21-26, p. 1231 (1995).
99. Perera, I. K.; Perkins, J.; Kantartzoglou, S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 180 (1995).
100. Xiang, F.; Beavis, R. C.: *Org. Mass Spectrom.*, **28**, 1424 (1993).
101. Kaufmann, R.; Kirsch, D.; Spengler, B.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **131**, 355 (1994).
102. Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.: *J. Phys. Chem.* **96**, 9678 (1992).
103. Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Jaeger, E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 105 (1992).
104. Kaufmann, R.; Kirsch, D.; Spengler, B.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **5**, 198 (1991).
105. Kaufmann, R.; Spengler, B.; Lutzenkirchen, F.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 902 (1993).
106. Cole, R. B.: *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Hardcover, ISBN 0-471-14564-5 (1997).
107. Gaskell, S. J.: *J. Mass Spectrom.* **32**, 677 (1997).
108. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, Ch. K.; Wong, Sh. F.; Whitehouse, C. M.: *Mass Spectrom. Rev.* **9**, 37, (1990).
109. Yervey, A. L.; Edmonds, C. G.; Lewis, I. A. S.; Vestal, M. L.: *Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry Techniques and Applications*, Plenum Publ. Co., New York (1989).
110. Vestal, M. L.: *Mass Spec. Rev.*, **3**, 447 (1983).
111. Fenn, J. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **4** (7), 524, (1993).
112. Dole, M.; Mac, L.L.; Hines, R.L.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.P.; Alice M.B.: *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240 (1968).

113. Dr. Alison E. Ashcroft: Mass Spectrometry Facility Manager, Astbury Centre for Structural Molecular Viology, Astbury Building, The University of Leeds.
114. Kéki, S.; Szilágyi, L. Sz.; Deák, Gy.; Zsuga, M.: *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **17(8)**, 783 (2003).
115. Chiarelli, M. P.; Lay, J. O. Jr.: *Spectral Methods in Food Analysis*, M. Masseba, Marcel Decker (Ed.), New York, 291 (1999).
116. Lee, M. S.; Kerns, E. H.: *Mass Spectrom. Rev.*, **18**, 187 (1999).
117. Allen, M. C.; Shah, T. S.; Day, W. W.: *Pharm. Res.*, **15**, 93 (1998).
118. Kelleher, N. L.: *Chem. Biol.*, **7**, R37–R45 (2000).
119. Bard, Y.: *Nonlinear Parameter Estimation*, New York Acedemic Press (1974).
120. Knickelbein, M. B.; Koretsky, G. M.: *J. Phys. Chem. A.* **102**, 580-586 (1998).
121. Dietrich, G.; Kruckeberg, S.; Lutzenkirchen, K.; Schweikhard, L.; Walther, C.: *J. Chem. Phys.* **112**, 752 (2000).
122. Koretsky, G. M.; Knickelbein, M. B.; Rousseau, R.; Marx, D. *J. Phys. Chem. A.* **105**, 11197 (2001).
123. Gerhards, M.; Thomas, O. C.; Nilles, J. M.; Zheng, W. J.; Bowen, K. H., Jr.: *J. Chem. Phys.* **116**, 10247 (2002).
124. Domon, B.; Costello, C. E.: *Glycoconj. J.* **5**, 397 (1988).
125. Wen-Gang, C.; Guang-Hui, W.; Sheng, J.; Heng-Liang, J.: *Org. Mass Spectrom.* **15**, 643 (1980).
126. Pócsfalvi, G.; Lévai, A.; Dinya, Z.; Somogyi, Á.; Vékey, K.: *Org. Mass Spectrom.* **29**, 303 (1994).
127. Xu, J.; Zuo, G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2373 (2000).
128. Xu, J.; Wu, H.; Jin, S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 908 (1999).
129. Xu, J.; Lan, R.; Jin, S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1506 (1999).
130. Lévai, A.: *Heterocycl. Commun.* **3**, 211 (1997).
131. Lévai, A.: *Heterocycl. Commun.* **8**, 227 (2002).
132. Lévai, A.: *Sci. Pharm.* **64**, 523 (1996).
133. Domingues, M. R.; Marques, M. G.; Vale, C. A. M.; Neves, M. G.; Cavaleiro J. A. S.; Ferrer-Correia, A. J.; Nemirovskiy, O. V.; Gross, M. L.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 217 (1998).
134. Kéki, S.; Deák, Gy.; Lévai, A.; Zsuga, M.: *J. Mass Spectrom.* **38**, 1207 (2003).
135. Shoeib, T.; Cunje, A.; Hopkinson, A. C.; Siu, K. W. M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 408 (2002).

136. Krapcho, J.; Turk, C. H. F.: *U. S. Pat.* 3 309 361 (1967); *C. A.*; **68**, 2930 (1968).
137. Bernstein, J.: *U. S. Pat.* 3 341 521 (1967); *C. A.* **68**, 95875 (1968).
138. Schindler, W.; Blettner, H.: *Swiss Pat.* 481 128 (1969); *C. A.* **72**, 90543 (1970).
139. Schenker, K.: *Swiss Pat.* 505 850 (1971); *C. A.* **75**, 98600 (1971).
140. Waefelaer, A.: *Ger. Offen.* 2 100 654 (1971); *C. A.* **75**, 129856 (1971).
141. Lévai, A.; Timár, T.; Frank, L.; Hosztafi, S.: *Heterocycles* **34**, 1523 (1992).
142. Ott, J.; Lévai, A.: *Arch. Pharm.* **323**, 601 (1990).
143. Coulson, C. J.; Wooldridge, K. R. H.; Memel, J.; Millard, B. J.: *J. Chem. Soc. (C)*, 1164 (1971).
144. Lévai, A.; Bálint, Z.: *Arch. Pharm.* **326**, 73 (1993).
145. Bonsignore, L.; Loy, G.; Maccioni, E.; Podda, G.; Seraglia, R.; Traldi, P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 137 (1991).
146. Kaye, P. T.; Whittall, R. D.: *S.-Afr. Tydskr. Chem.* **44(1)**, 30 (1991).
147. Khalil, Z.H.; Yanni, A.S.: *J. Ind. Chem. Soc.* **58(2)**, 168 (1981).
148. Dhal, P.N.; Achary, T.E.; Nayak, A.: *J. Ind. Chem. Soc.* **52(12)**, 1196 (1975).
149. Lombardino, J.G.; Otterness, I.G.: *J. Med. Chem.* **24(7)**, 830 (1981).
150. Mishriky, N.; Asaad, F.M.; Ibrahim, Y.A.; Girgis, A.S.: *Pharmazie*, **51(8)**, 544 (1996).
151. Brown, R.E.; Shavel, J.Jr.: *U.S. patent*; 4 (1972).
152. Sayed, G.H.; Kjosien, H.: *Indian J. Chem., Section B: Org. Chem. Inc. Med. Chem.* **20B(8)**, 640 (1981).
153. Sayed, G.H.; Kjosien, H.: *Indian J. Chem., Section B: Org. Chem. Inc. Med. Chem.* **19B(11)**, 980 (1980).
154. Srzic, D.; Klasinc, L.; Noppel, H.E.; Guesten, H.: *Org. Mass Spectrom.* **13(1)**, 30 (1978).
155. Saad, E.F.; Hamada, N.M.; Sharaf, S.M.; El Sadany, S.K.; Moussa, A.M.; Elba, M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12(13)**, 833 (1998).
156. Lévai, A.; Jekő, J.J.: *Heterocyclic Chem.* **43(1)**, 111 (2006).
157. Lévai, A.; Patonay, T.; Silva, A.M.S.; Pinto, D.C.G.A.; Cavaleiro, J.A.S.: *J. Heterocyclic Chem.* **39(4)**, 751 (2002).
158. Lévai, A.: *J. Heterocyclic Chem.* **39(1)**, 1 (2002).
159. Hopfgartner, G.; Chernushevich, I.V.; Covey, T.; Plomley, J.B.; Bonner, R.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10(12)**, 1305 (1999).
160. Sleno, L.; Volmer, D.A.; Marshall, A.G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16(2)**, 183 (2005).

161. Kéki, S.; Nagy, L.; Deák, Gy.; Lévai, A.; Zsuga, M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18(12)**, 1259 (2004).
162. Meija, J.; Caruso, J.A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15(5)**, 654 (2004).
163. [Forbes, M.W.](#); [Volmer, D.A.](#); [Francis, G.J.](#); [Bohme, D.K.](#): *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 779 (2005).
164. Bard, Y.: *Nonlinear Parameter Estimation*, New York Academic Press (1974).
165. [Capone, S.](#); [Derobertis, A.](#); [Destefano, C.](#); [Scarcella, R.](#): *Talanta*, **32**, 675.
166. [Sammes, P.G.](#); [Yahioğlu, G.](#): *Chem. Soc. Rev.* **23**, 327 (1994).
167. [Bandyopadhyay, S.](#); [Mukherjee, G.N.](#); [Drew, M.G.B.](#): *Inorg. Chim. Acta*, **358**, 3786 (2005).
168. [Ishimori, K.](#); [Imura, H.](#); [Ohashi, K.](#): *Anal. Chim. Acta*, **454**, 241 (2002).
169. [Mudasir, Yoshioka, N.](#); [Inoue, H.](#): *J. Inorg. Biochem.* **77**, 239 (1999).
170. [Schneider, B.B.](#); [Chen, D.D.Y.](#): *Anal. Chem.* **72**, 791 (2000).
171. [Schneider, B.B.](#); [Douglas, D.J.](#); [Chen, D.D.Y.](#): *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 772 (2001).

VIII. Tudományos közlemények és előadások

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, László Somogyi, Albert Lévai, György Deák, Miklós Zsuga: Cationization of Simple Organic Molecules by Singly Charged Ag_3^+ Cluster Ions in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Metal Cluster-Molecule Interactions. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, **15**, 879 (2004) IF: 3,79
- ii. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, Albert Lévai, György Deák, Miklós Zsuga: Post-source Decay Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Study of Tetracyclic 2,3-Dihydro-1,5-Benzothiazepines. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **18**, 1259 (2004) IF: 2,79
- iii. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, György Deák, Albert Lévai, Miklós Zsuga: Matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometric study of 2,3-dihydro-1,4-benzoxazepines. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, **19**, 1263 (2004) IF: 3,08
4. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, János Török, György Deák, Miklós Zsuga: A Simple Method for Estimating Activation Energies Using the Fragmentation Yield: Collision-Induced Dissociation of Iron(II)-Phenanthroline Complexes in an Electrospray Ionization Mass Spectrometer. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, **17**, 962 (2006) IF: 3,62
5. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, János Török, Katalin Tóth, Albert Lévai, Miklós Zsuga: Energy-variable collision-induced dissociation study of 1,3,5-trisubstituted 2-pyrazolines by electrospray mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, **21**, 1799 (2007) IF: 3,08

Össz impact faktor: 16,36

Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek:

1. S. Kéki, L. Nagy, Gy. Deák, M. Zsuga: Charging and Multiple Charging of Poly(Propylene Glycol) by Electrospray in the Presence of Binary Mixtures of Various Cations, **22th Informal Meeting on Mass Spectrometry (előadás) (2-6 May, 2004, Tokaj, Hungary)**
2. Nagy L., Kéki S., Deák Gy., Zsuga M.: Arany klaszterek tanulmányozása MALDI-TOF tömegspektrometriával, **IX. Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2003. november 14-16.**
3. Kéki Sándor, Nagy Lajos, Deák György, Lévai Albert, Zsuga Miklós: Tetraciklikus 2,3-dihidro-1,5-benzotiazepinek bomlásának vizsgálata mátrixsegített lézer deszorpció/ ionizációs tömegspektrometriával. **X. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár (2004. november 12-14.)**
4. Nagy Lajos, Kéki Sándor, Deák György, Zsuga Miklós: Poli(propilén-glikol) kationizációjának vizsgálata ESI-TOF tömegspektrometriával. **X. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár (2004. november 12-14.)**
5. Nagy Lajos, Kéki Sándor, Deák György, Lévai Albert, Zsuga Miklós: 2,3-dihidro-1,4-benzoxazepin származékok tanulmányozása MALDI és elektrospray ionizációs tömegspektrometriával, **XI. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia (2005. november 11 – 13.).**
6. Nagy Lajos, Kéki Sándor, Deák György, Zsuga Miklós: Poli(propilén-glikol) kationizációjának vizsgálata ESI körülmények között, **MTA, Polimer Munkabizottság Doktoranduszok fóruma, Debrecen (2006. április 04.)**
7. Kéki Sándor, Nagy Lajos, Török János, Zsuga Miklós: Poliéterek kationizációja elektroporlasztásos körülmények között, **Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (2007. május 11-13.)**

8. **Nagy Lajos**, Kéki Sándor, Deák György, Zsuga Miklós: Poli(propilén-glikol) kationizációja biner-kationelegyek jelenlétében, **Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (2007. május 11-13.)**

9. **Nagy Lajos**: Kis molekulatömegű vegyületek fragmentációjának vizsgálata MALDI és elektroporlasztásos körülmények között, **MTA, Polimer Munkabizottság Doktoranduszok fóruma, Debrecen (2007. november 28.)**

Egyéb közlemények:

1. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, György Deák, Miklós Zsuga: Bimetallic Silver-Gold Clusters by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** **15**, 1455 (2004) IF: 3,76
2. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, György Deák, Miklós Zsuga: Multiple Charging of Poly(Propylene Glycol) by Binary Mixtures of Cations in Electrospray. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, **16**, 152 (2005) IF: 3,76
3. Sándor Kéki, Gyula Batta, Ilona Bereczki, Zsolt Fejes, **Lajos Nagy**, Ágnes Zajác, Lili Kandra, Imre Kiricsi, György Deák, Miklós Zsuga, Pál Herczegh: New types of α -amylase enzyme-inhibitory polysaccharides from D-glucal. **Carb. Polym.** **63**, 136 (2006) IF: 1,58
4. Sándor Kéki, János Török, **Lajos Nagy**, Miklós Zsuga: Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of polyisobutylene derivatives. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** **19**, 656 (2008) IF: 3,31
5. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, Ákos Kuki, Miklós Zsuga: A New Method for Mass Spectrometry of Polyethylene Waxes: The Chloride Ion Attachment Technique by Atmospheric Pressure Photoionization, **Macromolecules**, megjelenés alatt (2008) IF: 4,28
6. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, Ákos Kuki, Gábor Pintér, Pál Herczegh, Miklós Zsuga: Tandem Mass Spectrometric Study of Ciprofloxacin-Poly(ethylene glycol) Conjugate in the Presence of Alkali Metal Ions, **Int. J. Mass Spectrom.** megjelenés alatt (2008) IF: 2,34

Össz impact faktor: 19,03

Egyéb konferencia előadások és poszterek:

1. Sándor Kéki, Miklós Nagy, György Deák, **Lajos Nagy**, Pál Herczegh, Albert Lévai, Miklós Zsuga: Novel Synthesis and MALDI-TOF MS Characterization of Dihydroxy Telechelic Polyisobutylene, **IUPAC International Symposium on Ionic Polymerization, Boston, MA, June 30-July 04. 2003, (poszter)**
2. Sándor Kéki, Miklós Nagy, György Deák, **Lajos Nagy**, Pál Herczegh, Albert Lévai, Miklós Zsuga: Monitoring the Reactions of Polymers by MALDI-TOF Mass Spectrometry, **28th International Conference on Solution Chemistry, August 23-28, 2003, Debrecen, Hungary. (előadás)**
3. Sándor Kéki, Miklós Nagy, György Deák, **Lajos Nagy**, Pál Herczegh, Albert Lévai, Miklós Zsuga: MALDI-TOF MS Characterization of Telechelic Polyisobutylenes, **6th Austrian Polymer Meeting, XXIst International H.F. Mark Symposium, 15-17 September, 2003, Vienna, Austria (előadás)**
4. Bereczki Ilona, Herczegh Pál, Kéki Sándor, Batta Gyula, Fejes Zsolt, Zsuga Miklós, Deák György, **Nagy Lajos**, Zajác Ágnes, Kandra Lili, Kiricsi Imre: Új típusú polikondenzációs reakció Ferrier-átrendeződéssel. Új poliszacharidok szintézise glükózszármazékok polikondenzációjával. **X. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár (2004. november 12-14.)**
5. **Nagy Lajos**, Kéki Sándor, Török János, Deák György, Zsuga Miklós: Fe(II)-fenantrolin komplexek vizsgálata elektroporlasztásos körülmények között, **XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, Románia (2006. október 03-08.)**
6. Sándor Kéki, **Lajos Nagy**, Ákos Kuki, Miklós Zsuga: Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of highly non-polar polymers, **26th Informal Meeting on Mass Spectrometry (előadás) (4-8 May, 2008, Fiero di Primiero, Italy)**
7. **Lajos Nagy**, Sándor Kéki, Ákos Kuki, Gábor Pintér, Pál Herczegh, Miklós Zsuga: Tandem mass spectrometric study of Ciprofloxacin-Poly(ethylene glycol) conjugate in

the presence of alkali metal ions, **International Polymer Seminar Gliwice 2008**
(poszter), (25-27 June, 2008, Gliwice, Lengyelország)